



(21)申請案號：108130010

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 22 日

(51)Int. Cl. : C08F220/34 (2006.01)

C12M3/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/08/24 日本

2018-157444

(71)申請人：日商日產化學股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL CORPORATION (JP)
日本(72)發明人：鈴木康平 SUZUKI, KOHEI (JP) ; 広井佳臣 HIROI, YOSHIOMI (JP) ; 安部菜月
ABE, NATSUKI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：5 共 58 頁

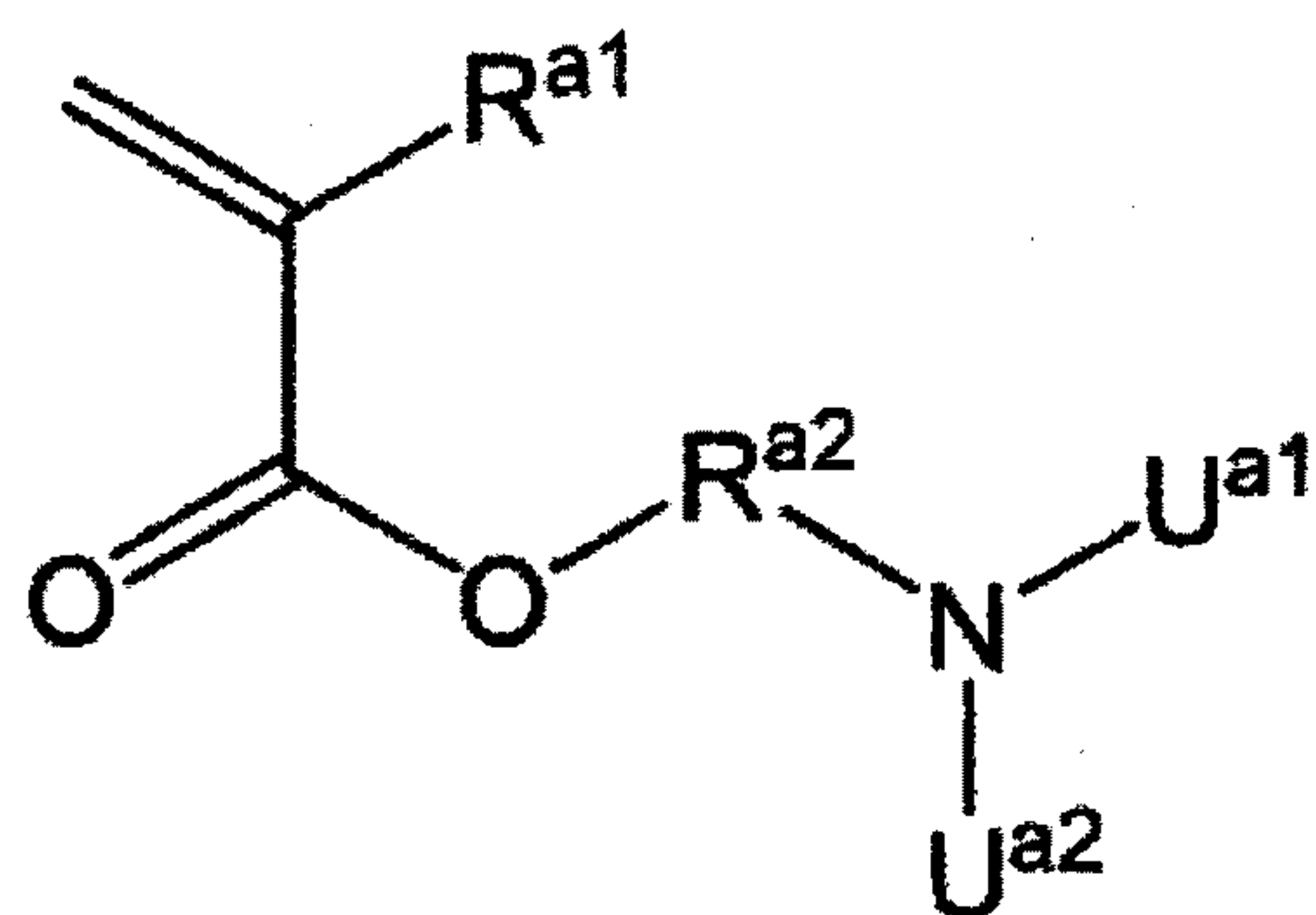
(54)名稱

作為細胞培養之基底膜使用之聚合物之製造方法及細胞培養容器

(57)摘要

本案發明為提供一種作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物之製造方法、細胞培養之基底膜形成劑、基底膜及細胞培養容器之製造方法。

本案發明中，作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物之製造方法包含調製下述式(I)表示之單體、自由基聚合起始劑及有機溶媒之混合物之調製步驟，及將前述混合物升溫且攪拌，使單體聚合，調製聚合物之聚合步驟，



(I)

[式中，U^{a1} 及 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數 1 至 5 之直鏈或分支烷基，R^{a1} 表示氫原子或碳原子數 1 至 5 之直鏈或分支烷基，R^{a2} 表示碳原子數 1 至 5 之直鏈或分支伸烷基]。



202024151

【發明摘要】

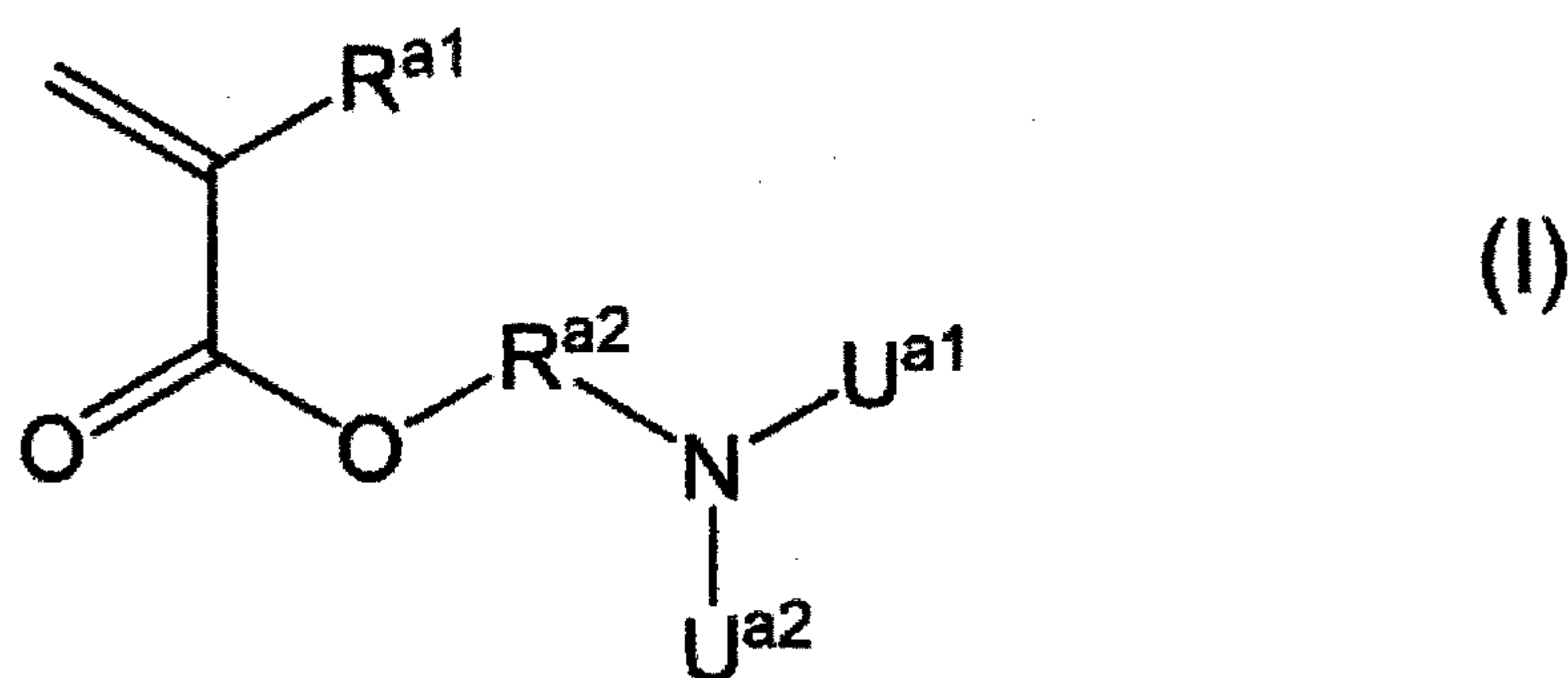
【中文發明名稱】

作為細胞培養之基底膜使用之聚合物之製造方法及細胞培養容器

【中文】

本案發明為提供一種作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物之製造方法、細胞培養之基底膜形成劑、基底膜及細胞培養容器之製造方法。

本案發明中，作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物之製造方法包含調製下述式(I)表示之單體、自由基聚合起始劑及有機溶媒之混合物之調製步驟，及將前述混合物升溫且攪拌，使單體聚合，調製聚合物之聚合步驟，



[式中， U^{a1} 及 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a1} 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a2} 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

【 指 定 代 表 圖 】 無
【 代 表 圖 之 符 號 簡 單 說 明 】 無

【 特 徵 化 學 式 】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

作為細胞培養之基底膜使用之聚合物之製造方法及細胞培養容器

【技術領域】

【0001】本發明為關於一種作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物之製造方法及具備前述基底膜之細胞培養容器之製造。

【先前技術】

【0002】熟知有將2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯(DMAEMA)之聚合之聚(2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯)(PDMAEMA)作為具有約32℃之霧點之溫度應答性聚合物。

【0003】以往之PDMAEMA之製造方法中，調製包含DMAEMA之混合物(調製步驟)，之後，對此混合物照射紫外線(照射步驟)，並藉由使DMAEMA進行自由基聚合，來製造PDMAEMA。

【0004】於此也需要存在，將鍵結於PDMAEMA之側鏈且包含陽離子性之2-N,N-二甲基胺基乙基之酯基的一部份藉由水解變換成陰離子性之羧基，來製造使物性變化之來自PDMAEMA之聚合物。

【0005】然而，使用上述以往之PDMAEMA之製造方

法，製造具有陽離子性之2-N,N-二甲基胺基乙基及陰離子性之羧基之來自PDMAEMA之聚合物時，藉由將於側鏈介隔著酯基具有陽離子性之2-N,N-二甲基胺基乙基之DMAEMA照射紫外線，並使其進行自由基聚合後，由於將酯基之一部份水解時，必須要產生陰離子性之羧基，因此會有製造時所需之步驟較多，或水解之比率的控制較困難，進而使分子量控制較困難之問題。

【0006】為了解決相關之問題，專利文獻1中有報告藉由將DMAEMA於水存在下照射紫外線，並使其進行自由基聚合，能夠製造具有陽離子性官能基及陰離子性官能基之來自聚(2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯)之聚合物(參照例如專利文獻1)。

【0007】然而，即使使用上述PDMAEMA之製造方法，會有控制陽離子性官能基與陰離子性官能基之比例較困難，且控制分子量較困難之課題，進而，作為陰離子性官能基，會有僅能使用將DMAEMA水解之甲基丙烯酸之問題。

【0008】專利文獻2中有報告藉由將DMAEMA於不存在水之下照射紫外線，調製PDMAEMA，接著藉由導入陰離子性單體，並照射紫外線，製造具有DMAEMA嵌段配列與DMAEMA與陰離子性單體之隨機配列之聚合物。上述製造方法中能夠賦予陰離子性官能基之選擇性(參照例如專利文獻2)。

【0009】然而，即使使用上述製造方法時，控制陽離

子性官能基與陰離子性官能基之比例較困難，且控制分子量或分子量分布較困難。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【 0010 】

[專利文獻 1] 特開 2014-162865 號公報

[專利文獻 2] 特開 2017-14323 號公報

[非專利文獻]

【 0011 】

[非專利文獻 1] Wetering P et al, J Controlled Release 49, p59-69, 1997.

[非專利文獻 2] Wetering P at al, Macromolecules 31, p8063-8068, 1998.

【 發明內容 】

[本發明欲解決之課題]

【 0012 】 本發明之目的為不需藉由如紫外線之光照射，由具有陽離子性官能基之單體與較佳為進而具有陰離子性官能基之單體，一邊控制分子量或分子量分布，較佳為一邊控制陽離子性官能基與陰離子性官能基之比例，來簡單地製造來自聚(2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯)之聚合物，進一步提供包含上述聚合物之細胞培養之基底膜、細胞培養之基底膜形成劑及細胞培養容器。

[解決課題之手段]

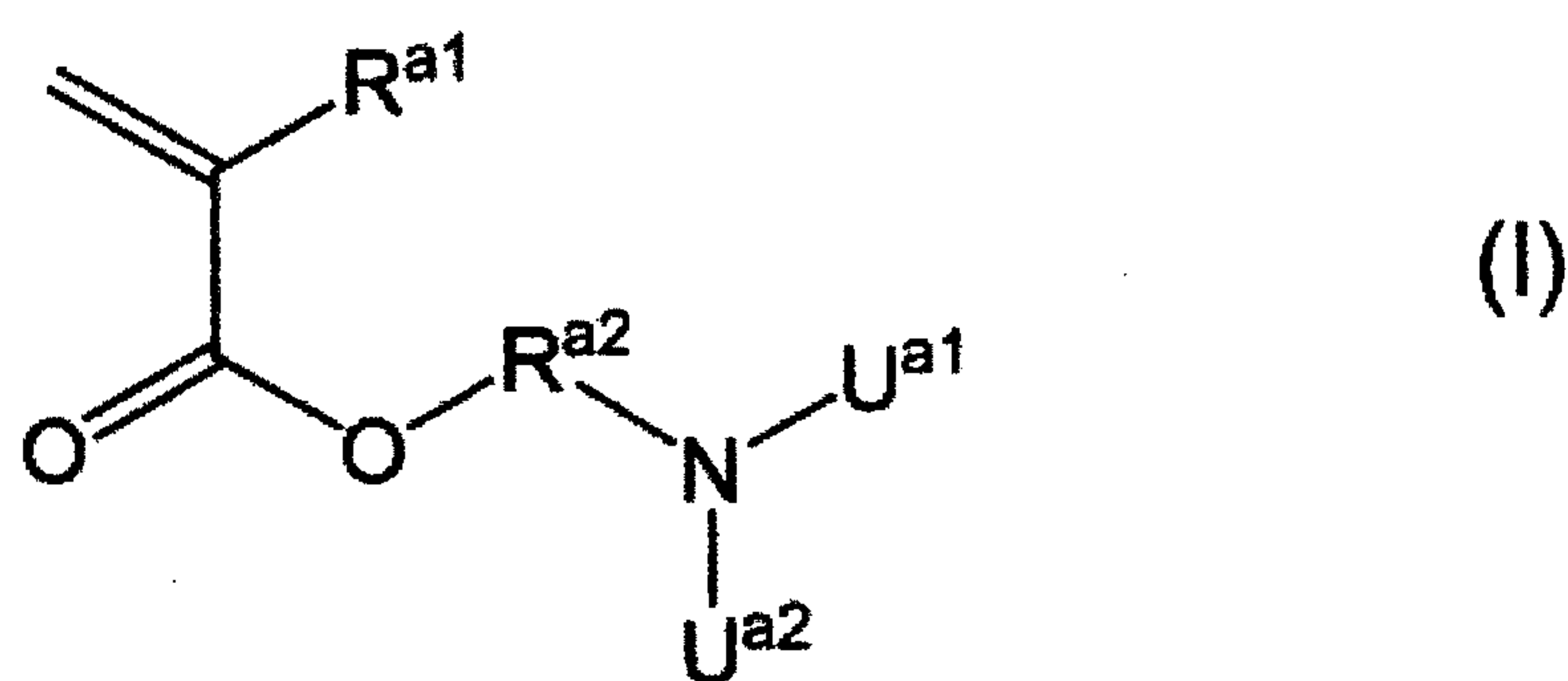
【0013】亦即，本發明為如以下所述：

[1] 一種聚合物之製造方法，該聚合物係作為細胞培養之基底膜來使用，且該製造方法包含

調製下述式(I)表示之單體、自由基聚合起始劑及有機溶媒之混合物之調製步驟，及

將前述混合物升溫且攪拌，使單體聚合，調製聚合物之聚合步驟，

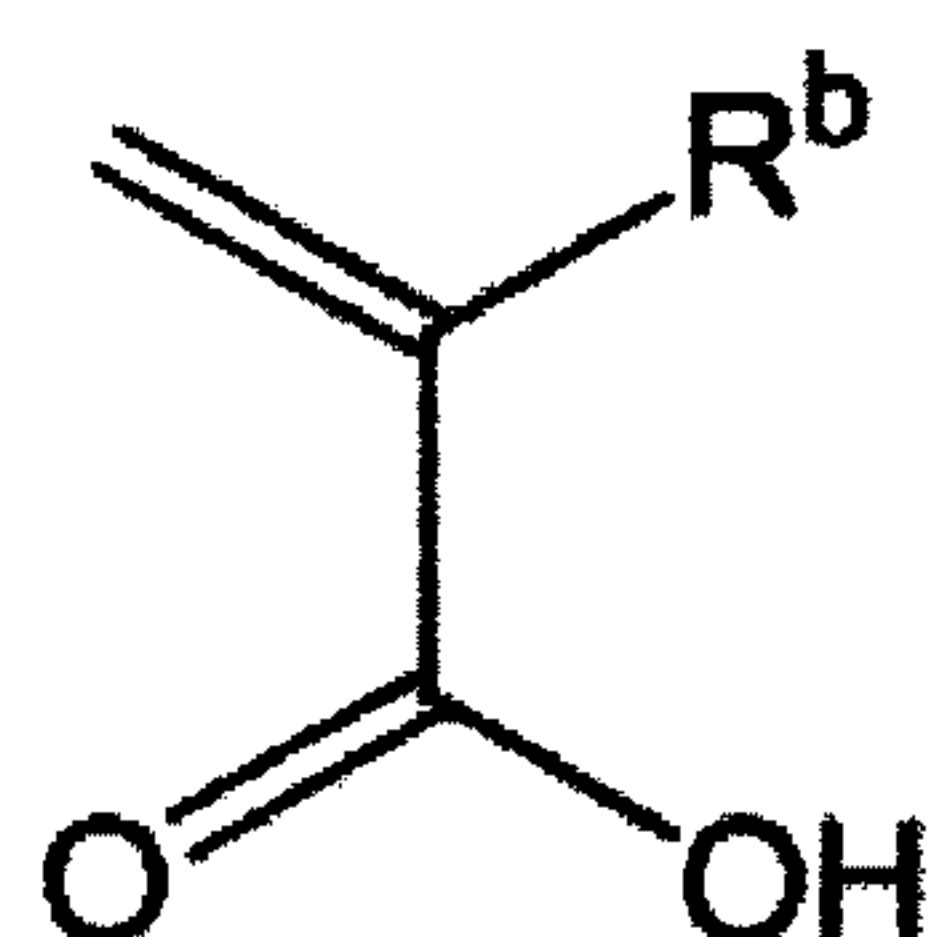
【化1】



[式中，U^{a1}及U^{a2}各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，R^{a1}表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，R^{a2}表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

【0014】[2] 如[1]之聚合物之製造方法，其中，進一步於上述混合物中包含式(II)表示之單體，

【化2】



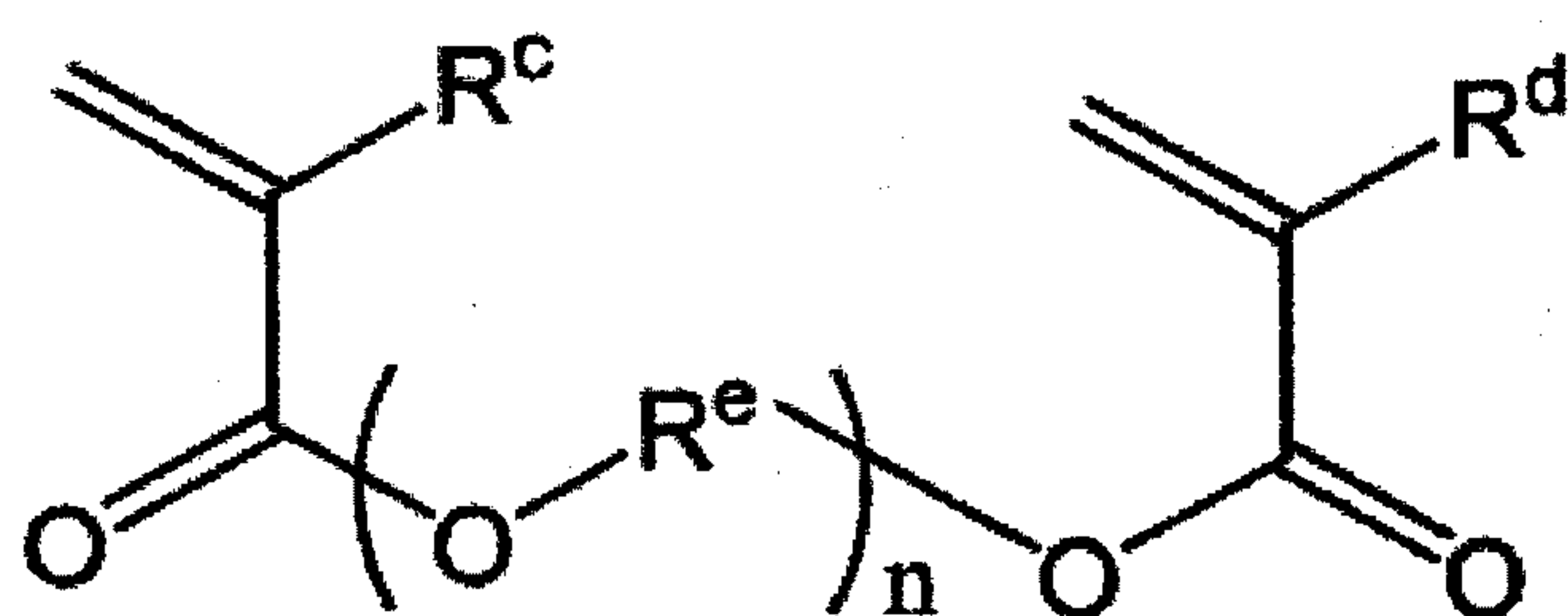
(II)

[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

【0015】[3] 如[1]或[2]之聚合物之製造方法，其中，進一步於上述混合物中包含具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體。

【0016】[4] 如[3]之聚合物之製造方法，其中，上述具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體為下述式(III)表示之單體，

【化3】



(III)

[式中， R^c 及 R^d 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^e 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基， n 表示1~50之數]。

【0017】[5] 如[1]~[4]中任一項之聚合物之製造方法，其中，前述聚合物中之來自式(I)表示之單體之單位/來自式(II)表示之單體之單位之莫耳比為100/0~50/50。

【0018】[6] 如[1]~[5]中任一項之聚合物之製造方法，其中，聚合物之重量平均分子量(M_n)為20,000~1,000,000，且聚合物之重量平均分子量(M_w)與前述數平均分子量(M_n)之比(M_w/M_n)為1.01~10.00。

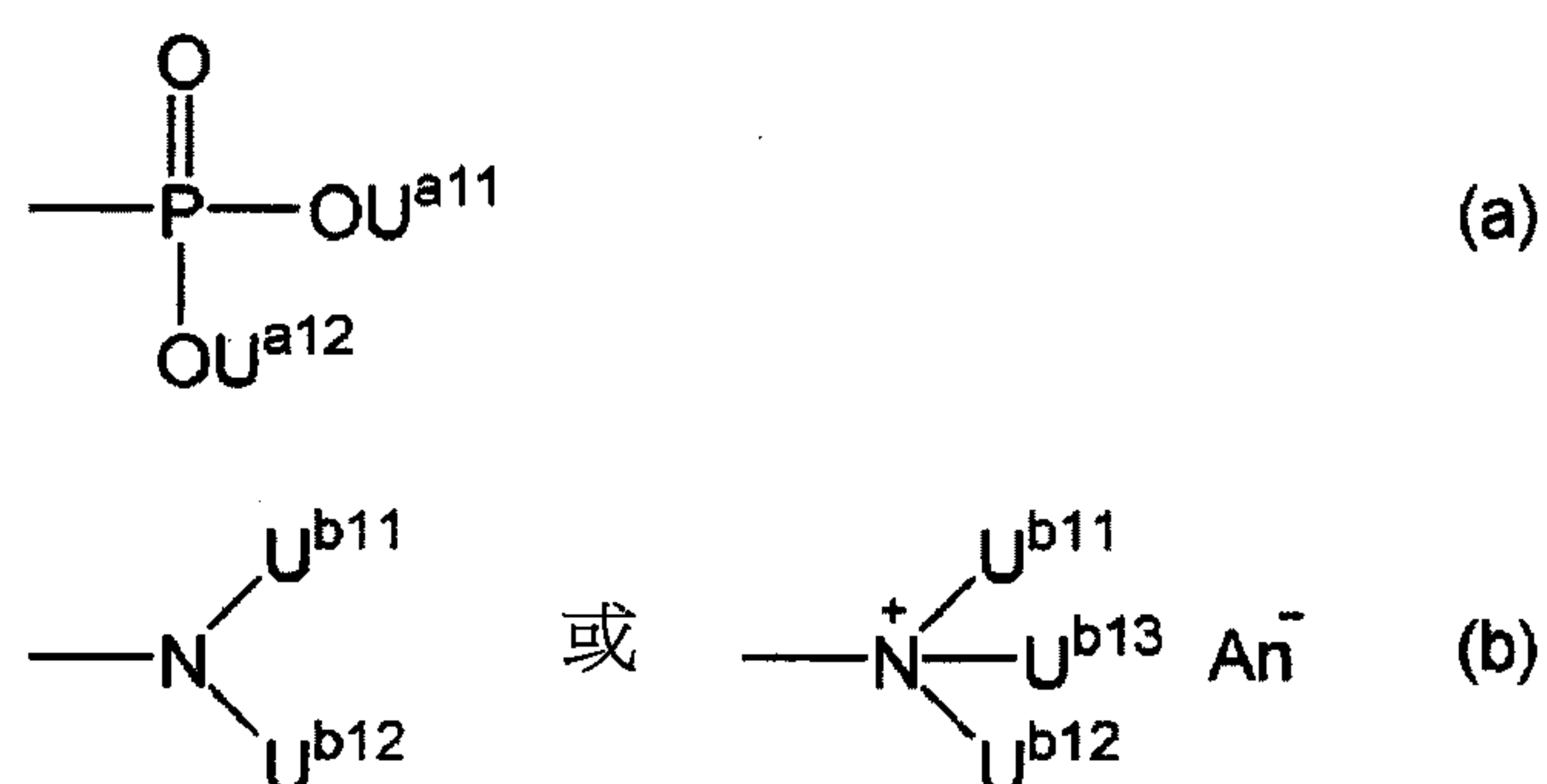
【0019】[7] 如[1]~[6]中任一項之聚合物之製造方法，其中，該聚合物係使用於作為用來使細胞接著後使其剝離，且得到細胞凝集塊之細胞培養之基底膜。

【0020】[8] 一種細胞培養之基底膜形成劑之製造方法，其係包含混合由如[1]~[7]中任一項之製造方法所得之聚合物與含水溶液之步驟。

【0021】[9] 一種細胞培養之基底膜之製造方法，其係包含將由如[8]之製造方法所得之細胞培養之基底膜形成劑塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟。

【0022】[10] 如[9]之細胞培養之基底膜之製造方法，其中，於上述塗布·乾燥步驟之前，進一步包含將包含共聚物與溶媒之塗布膜形成用組成物塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟，該共聚物包含：包含下述式(a)表示之有機基之重複單位與包含下述式(b)表示之有機基之重複單位，

【化 4】



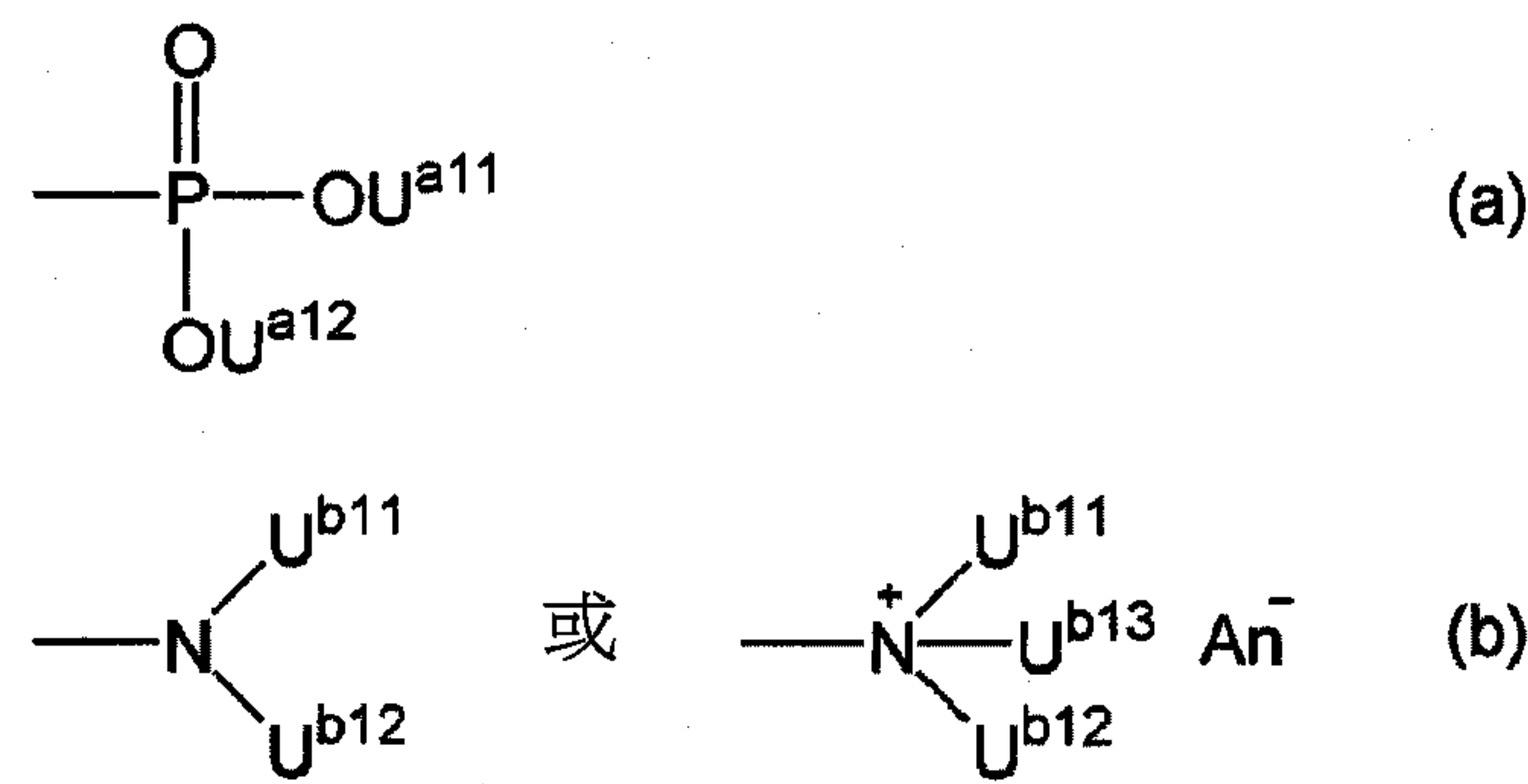
[式中， $\text{U}^{\text{a}11}$ 、 $\text{U}^{\text{a}12}$ 、 $\text{U}^{\text{b}11}$ 、 $\text{U}^{\text{b}12}$ 及 $\text{U}^{\text{b}13}$ 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， An^- 表示選自鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子]。

【0023】[11] 如[9]之細胞培養之基底膜之製造方法，其中，上述容器或基板具有細胞之附著抑制能。

【0024】[12] 一種細胞培養容器之製造方法，其係包含將由如[8]之製造方法所得之細胞培養之基底膜形成劑塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟。

【0025】[13] 如[12]之細胞培養容器之製造方法，其係於上述塗布·乾燥步驟之前，進一步包含將包含共聚物與溶媒之塗布膜形成用組成物塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟，且該共聚物包含：包含下述式(a)表示之有機基之重複單位與包含下述式(b)表示之有機基之重複單位，

【化 5】

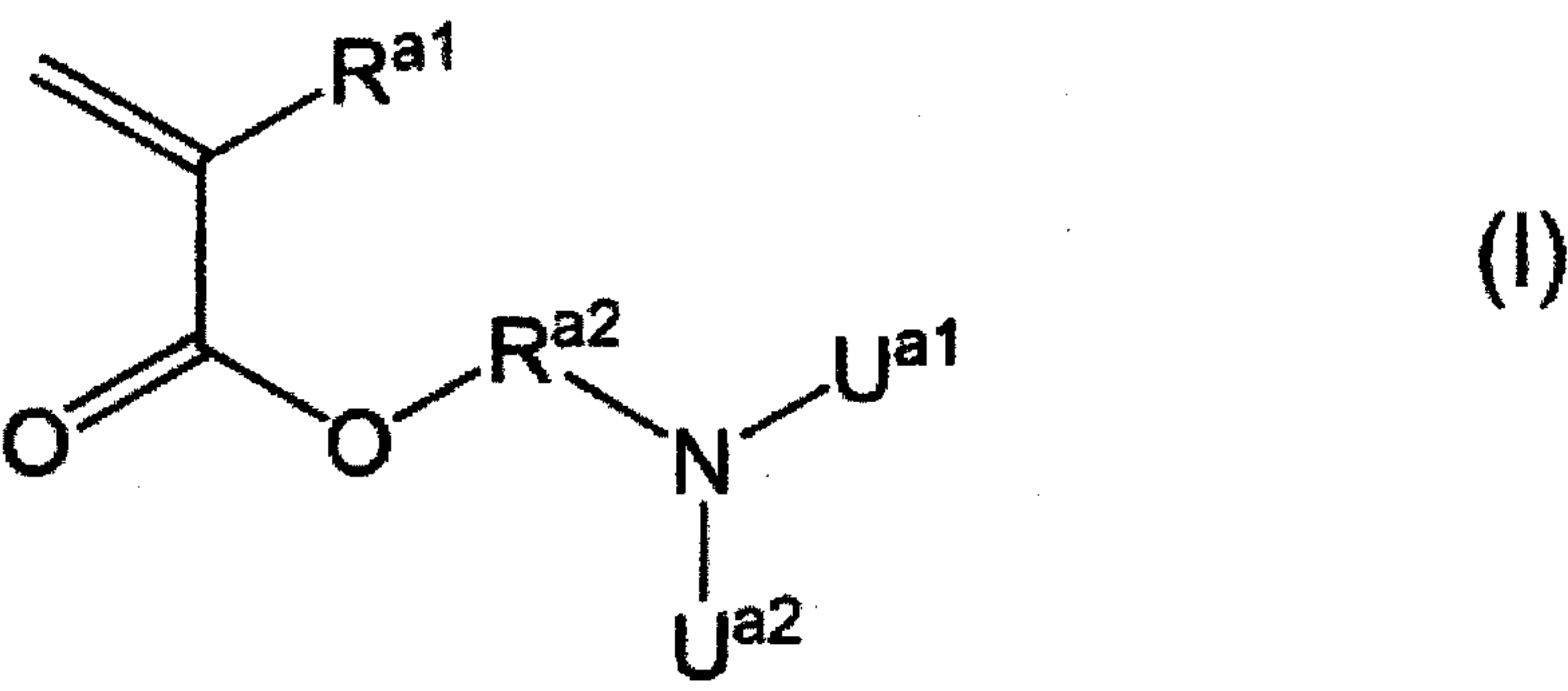


[式中，U^{a11}、U^{a12}、U^{b11}、U^{b12}及U^{b13}各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，An⁻表示選自鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子]。

【0026】[14] 如[12]之細胞培養容器之製造方法，其中，上述容器或基板具有細胞之附著抑制能。

【0027】[15] 一種細胞凝集塊之製造方法，其係將包含來自下述式(I)表示之單體之單位之聚合物作為細胞培養之基底膜來使用，

【化 6】



[式中，U^{a1}及U^{a2}各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，R^{a1}表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，R^{a2}表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷

基]。

【0028】[16] 如[15]之細胞凝集塊之製造方法，其中，上述聚合物為進一步包含來自式(II)表示之單體之單位之共聚物，

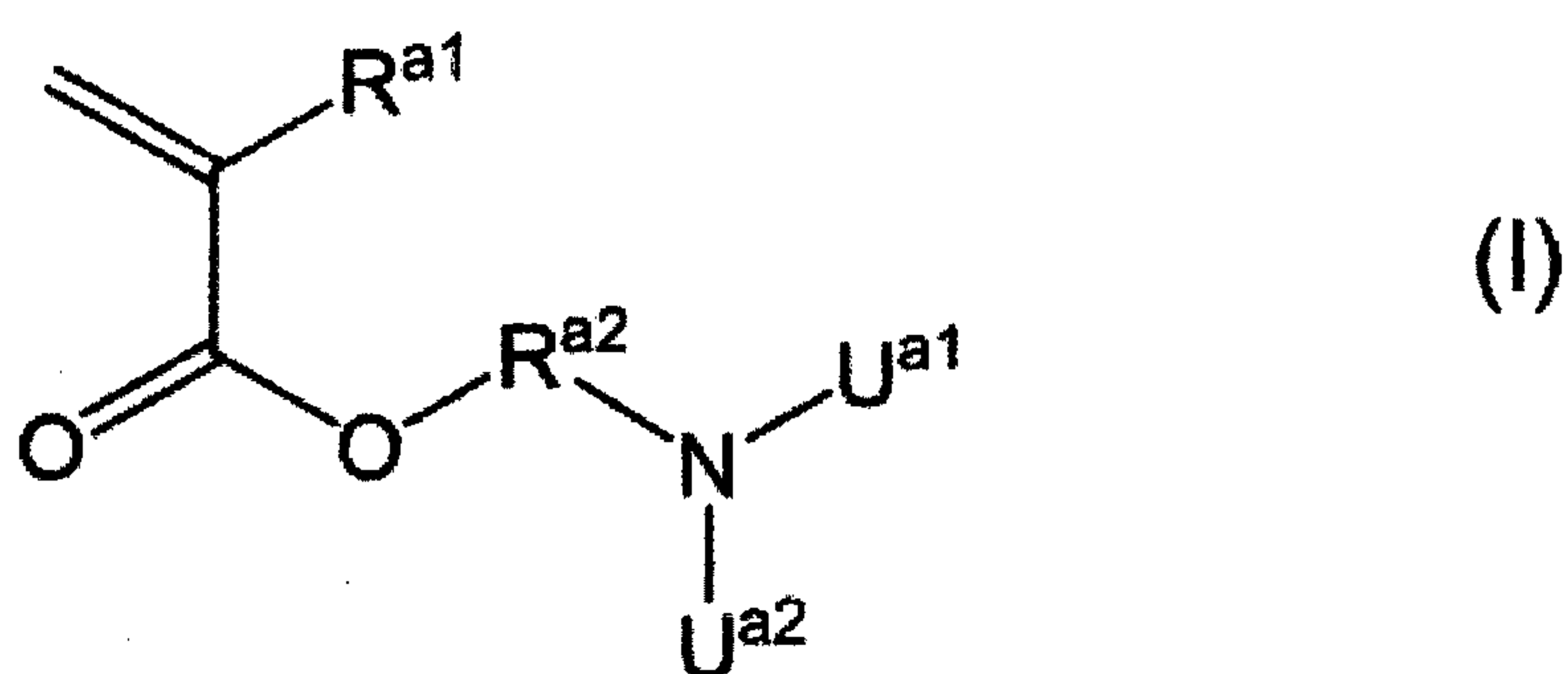
【化7】



[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

【0029】[17] 一種包含來自下述式(I)表示之單體之單位之聚合物之使用，其係作為用來使細胞接著後使其剝離，且得到細胞凝集塊之細胞培養之基底膜，

【化8】



[式中， U^{a1} 及 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a1} 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a2} 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

【0030】[18] 如[17]之使用，其係作為用來使細胞接著後使其剝離，且得到細胞凝集塊之細胞培養之基底膜，其中，上述聚合物為進一步包含來自式(II)表示之單體之單位之共聚物，

【化9】



[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

[發明效果]

【0031】藉由本案發明，不需藉由如紫外線之光照射，由具有陽離子性官能基之單體與較佳為進而具有陰離子性官能基之單體，一邊控制分子量或分子量分布，較佳為一邊任意地控制陽離子性官能基與陰離子性官能基之比例，能夠簡單地製造來自聚(2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯)之聚合物。藉由一邊控制分子量一邊製造，能夠容易提升對基材之塗布性。

【圖式簡單說明】

【0032】

[圖1]實施例2之(塗布膜之表面形狀觀察)中，表示合

成例3及合成例8之聚合物之以接觸針膜厚計所得之表面形狀測定結果之圖。

[圖2]實施例4之(4-3.細胞附著實驗)中，觀察具備將合成例3及合成例4之聚合物作為基底膜之聚合物塗布盤中接著細胞的狀況之照片。

[圖3]實施例4之(4-4.細胞凝集塊之觀察)中，觀察具備將合成例3及合成例4之聚合物作為基底膜之聚合物塗布盤中細胞凝集塊的狀況之照片。

[圖4]實施例5之(5-3.細胞附著實驗)中，觀察具備將合成例1、10、11及12之聚合物作為基底膜之聚合物塗布培養盤中細胞的狀況之照片。

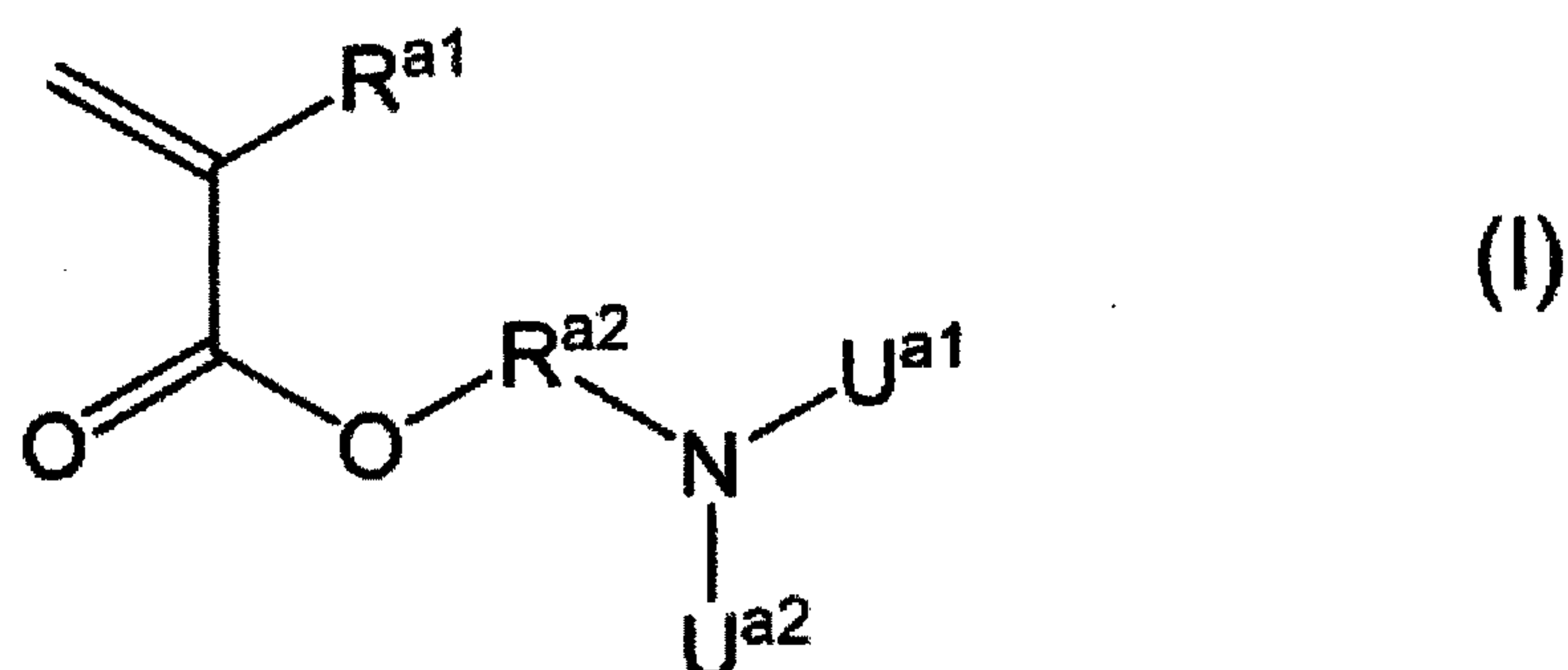
[圖5]實施例5之(5-4.細胞凝集塊之觀察)中，觀察具備將合成例1、10、11及12之聚合物作為基底膜之聚合物塗布培養盤中細胞凝集塊的狀況之照片。

【實施方式】

[作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物]

【0033】本案例中作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物為將下述式(I)表示之陽離子性單體聚合而得，

【化 1 0】



【0034】[式中， U^{a1} 、 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a1} 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a2} 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

【0035】上述聚合物為藉由聚合上述式(I)表示之陽離子性單體與下述式(II)表示之陰離子性單體所得之共聚物較佳，

【化 1 1】



[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

【0036】本說明書中，只要沒有另外定義，作為「碳原子數1至5之直鏈或分支烷基」，有舉例如甲基、乙基、*n*-丙基、異丙基、*n*-丁基、異丁基、*s*-丁基、*t*-丁基、*n*-戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、1,1-二甲基

丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基或1-乙基丙基。

R^{a1} 及 R^b 各自獨立為選自氫原子及甲基較佳。

U^{a1} 及 U^{a2} 各自獨立為選自氫原子、甲基、乙基、n-丙基、異丙基及n-丁基較佳，但為甲基或乙基較佳，為甲基最佳。

【0037】本說明書中，只要沒有另外定義，作為「碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基」，有舉例如伸甲基、伸乙基、伸丙基、三伸甲基、四伸甲基、1-甲基伸丙基、2-甲基伸丙基、二甲基伸乙基、乙基伸乙基、五伸甲基、1-甲基-四伸甲基、2-甲基-四伸甲基、1,1-二甲基-三伸甲基、1,2-二甲基-三伸甲基、2,2-二甲基-三伸甲基、1-乙基-三伸甲基等。此等之中，作為 R^{a2} ，為選自伸乙基及伸丙基較佳。

【0038】因此，作為上述式(I)表示之陽離子性單體，有舉出2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯、N-異丙基丙烯酸醯胺等，為2-N,N-二甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯較佳。作為上述式(II)表示之陰離子性單體，有舉出丙烯酸、甲基丙烯酸等，為甲基丙烯酸較佳。

【0039】前述聚合物中之來自式(I)表示之單體之單位/來自式(II)表示之單體之單位之莫耳比為100/0~50/50。較佳為98/2~50/50。再較佳為98/2~60/40，特別佳為98/2~70/30。

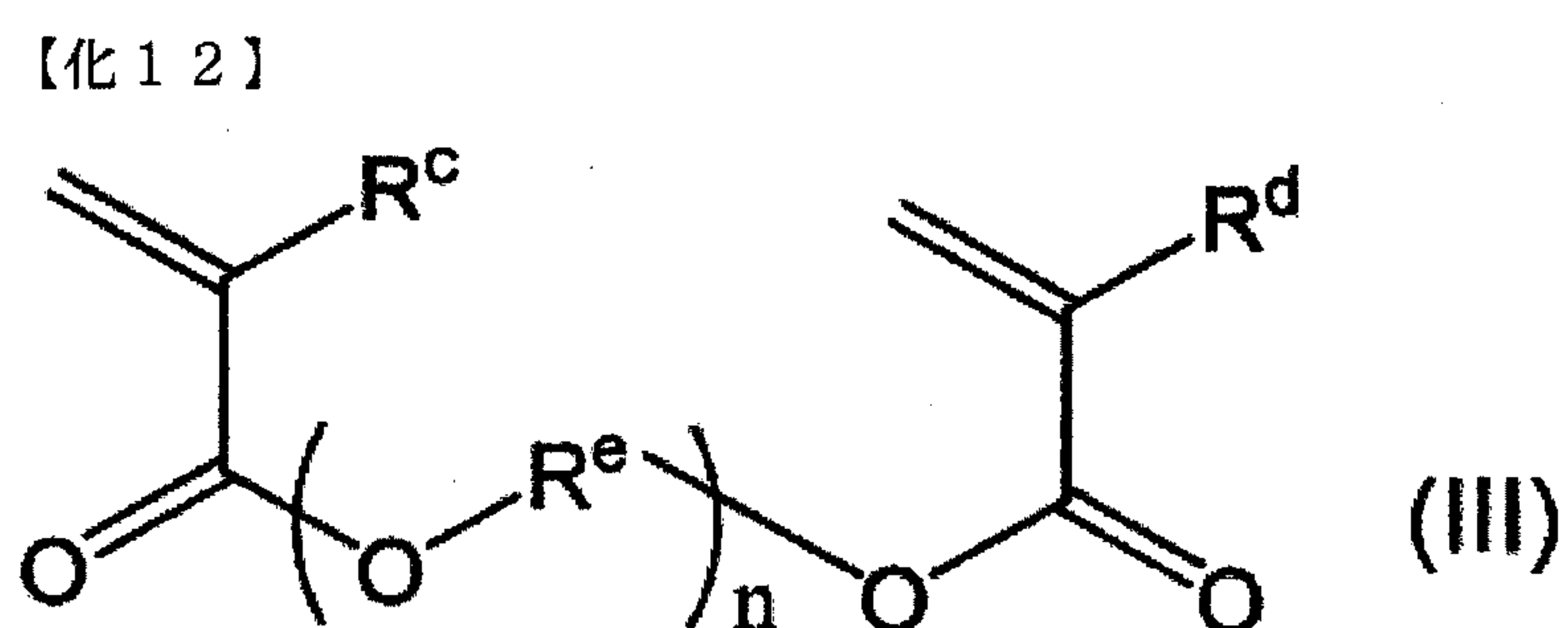
式(II)之莫耳比若在51以上，則聚合物之陰離子性會過多，細胞之接著力會降低。

【 0040 】

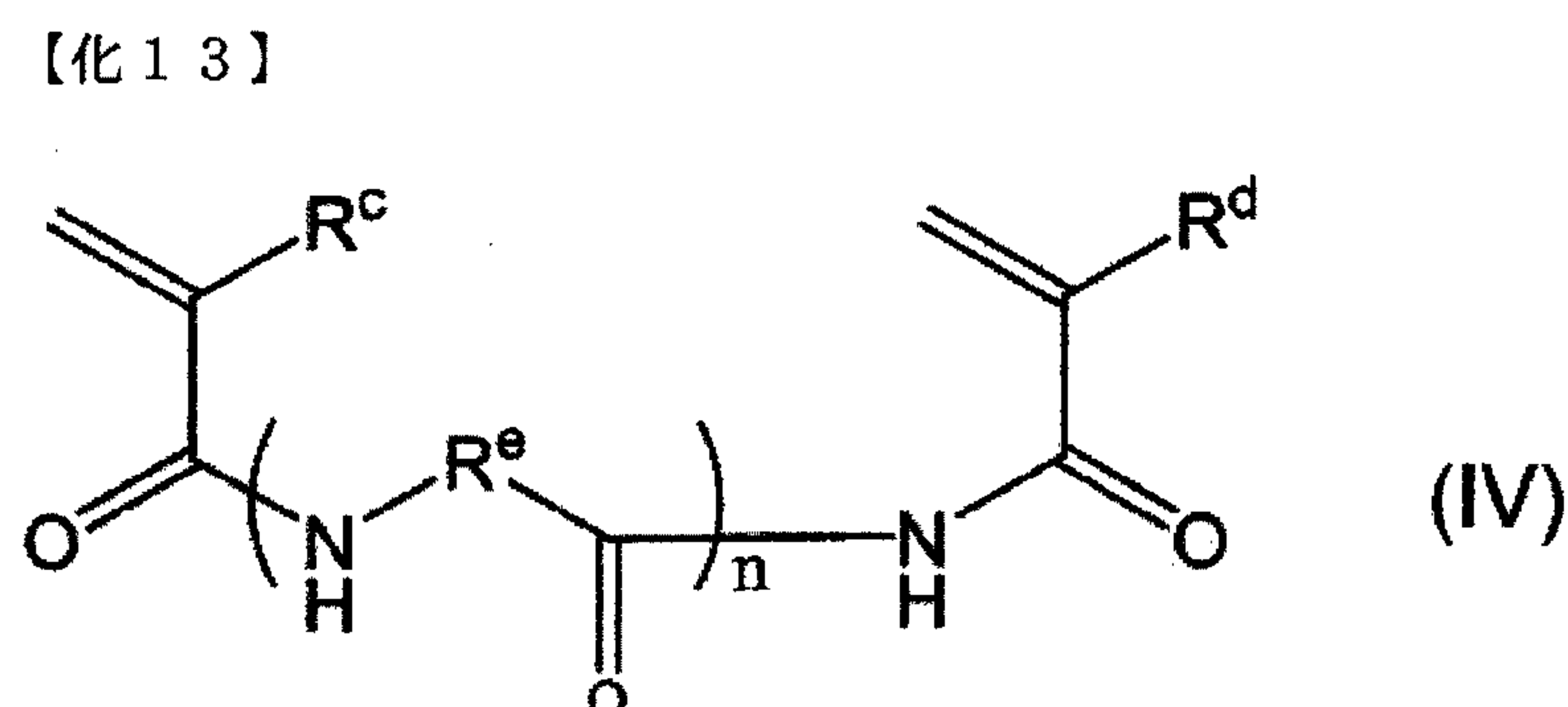
(具有2個以上碳—碳不飽和鍵結之單體)

上述聚合物亦可為藉由將式(I)/式(II)表示之單體與進而具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體聚合所得之聚合物。具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體具體來說意指具有2個以上碳-碳二重鍵結之單體，且有舉例如多官能丙烯酸酯化合物、多官能丙烯酸醯胺化合物、多官能聚酯或異戊二烯化合物等。

【 0041 】作為較佳具體例，有舉出下述式(III)~(V)表示之單體。

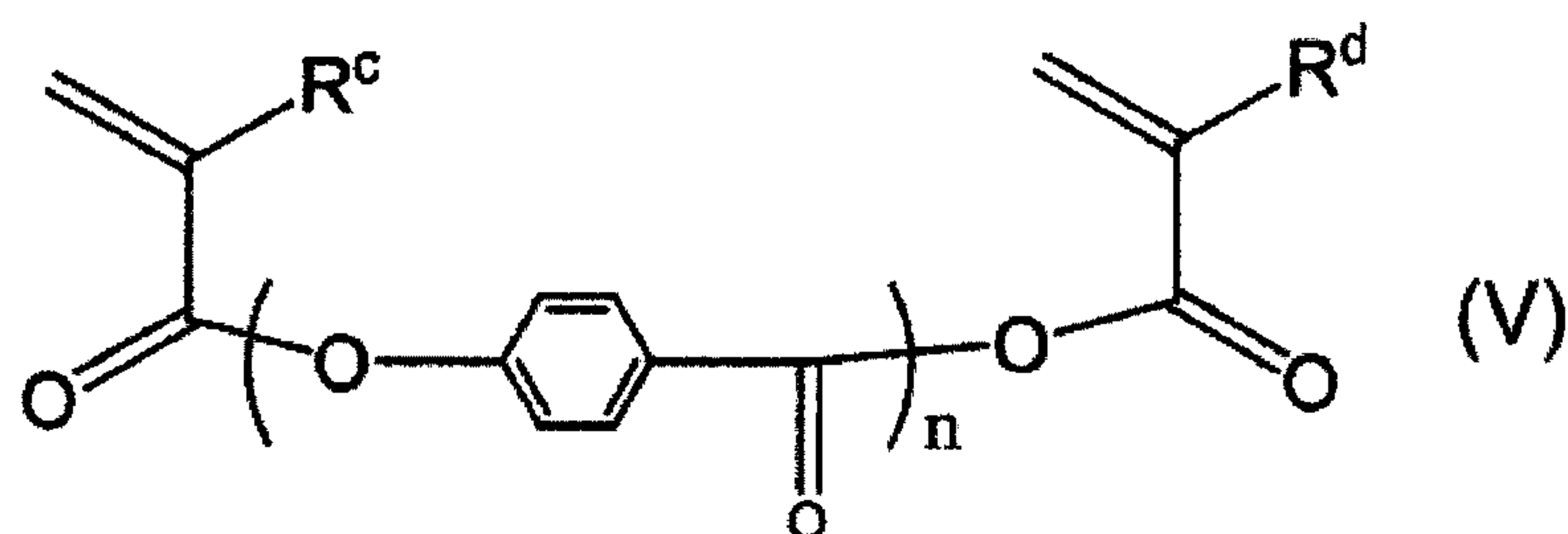


【 0042 】



【 0043 】

【化 1 4】



【0044】式中， R^c 及 R^d 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^e 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基， n 表示1~50之數。此等之中，為式(III)表示之單體較佳。

【0045】相對於前述聚合物全體，式(III)~(V)表示之單體之莫耳比為0~5.0%較佳。更較佳為0~3.0%。

式(III)~(V)之莫耳比若在5.0%以上，則由於過度交聯所造成之高分子量化，在製造中會有膠化且製造困難之虞。

R^c 及 R^d 各自獨立為選自氫原子及甲基較佳。

R^e 為選自伸甲基、伸乙基及伸丙基較佳，為伸乙基最佳。

n 為1~50之數，但 n 為1~30之數較佳，且 n 為1~10之數較佳。

【0046】相對於前述聚合物全體，式(II)表示之單體所佔之莫耳%之值與相對於前述調製步驟時單體之添加量全體，式(II)表示之單體所佔之莫耳%之值的差為0~10莫耳%。本案之聚合物以後述製造方法，單體之添加比與製造後聚合物之實測值的差較少，為0~10莫耳%。更較佳為

0~8莫耳 %。

【0047】前述聚合物之數平均分子量(M_n)為20,000~1,000,000，為50,000~800,000更較佳。

【0048】前述聚合物之重量平均分子量(M_w)與前述數平均分子量(M_n)之比(M_w/M_n)為1.01~10.00，為1.2~8.0較佳，為1.4~6.0較佳，為1.5~5.0較佳，為1.6~4.5較佳。

【0049】前述數平均分子量(M_n)與數平均分子量(M_n)能夠藉由例如實施例記載之 Gel Filtration Chromatography 來求出。

藉由利用本案之聚合物，能夠使細胞接著後，使其剝離，並形成細胞凝集塊。且，細胞凝集塊意指形成細胞凝集之結果之結構體，並不限定為如球狀或環狀等之形狀。與以往之在細胞低接著盤上以非接著培養所製作之細胞凝集塊相比，在接著面積之規定所得之細胞凝集塊的大小調整(能夠製造任意大小之細胞凝集塊)等之點具有好處。

【0050】

[作為細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造方法]

本案之聚合物能夠以熱聚合法來製造。例如將上述式(I)之單體溶解於有機溶媒，添加自由基聚合起始劑，因應必要，接著添加上述式(II)，進而再因應必要，添加具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體(式(III)~(V)表示之單體等)作為混合物後，充分攪拌均勻後，一邊以流入氮，一邊升溫至例如51℃以上，例如51~180℃，51~150℃，51~130℃，51~100℃，

例如溶媒之回流溫度(例如以四氫呋喃於66~85℃)，藉由例如攪拌1~48小時，得到聚合物(聚合物)。將所得之聚合物再沈澱，亦可以透析來純化。

【0051】於一實施型態中，能夠藉由下述製造方法來調製，該製造方法包含將上述式(I)之單體溶解於溶媒，添加聚合起始劑，因應必要，接著將上述式(II)之單體於溶媒中以兩化合物之合計濃度0.01質量%至40質量%，使其反應(聚合)之步驟。

【0052】作為上述聚合中使用之有機溶媒，有舉例如四氫呋喃、1,4-二氧雜環等之醚溶媒、甲醇、乙醇、異丙醇等之碳原子數1至4之脂肪族乙醇溶媒、甲苯等之芳香族烴基溶媒或其混合溶媒。

【0053】為了有效率地進行聚合反應，期望使用自由基聚合起始劑。作為自由基聚合起始劑之例，有舉出二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)、2,2'-偶氮雙(2,4-二甲基戊腈)(V-65、富士薄膜和光純藥(股)製)、2,2'-偶氮雙(異丁腈)(AIBN、富士薄膜和光純藥(股)製)、2,2'-偶氮雙[N-(2-羧基乙基)-2-甲基丙脒]_n水和物(VA-057、富士薄膜和光純藥(股)製)、2,2'-(N-丁基-2-甲基丙醯胺)(VAm-110、富士薄膜和光純藥(股)製)等之偶氮聚合起始劑。

作為聚合起始劑之添加量，相對於聚合所使用之單體合計重量，為0.05質量%~5質量%。

聚合起始劑之使用不僅能夠有聚合反應之效率化，也

能夠藉由末端官能基之修飾來調整聚合物物性。

【 0054】

[細胞培養之基底膜形成劑之製造方法]

藉由於前述聚合物中以自體公知之方法混合含水溶液，能夠製造細胞培養之基底膜形成劑。

含水溶液意指有舉出水、生理食鹽水或磷酸緩衝溶液等之鹽含有水溶液，或者組合水或含鹽之水溶液與乙醇之混合溶媒。作為乙醇，有舉出碳原子數2至6之乙醇，有舉例如乙醇、丙醇、異丙醇、1-丁醇、2-丁醇、異丁醇、t-丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、1-庚醇、2-庚醇、2,2-二甲基-1-丙醇(=新戊基乙醇)、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-1-丁醇、2-甲基-2-丁醇(=t-戊基乙醇)、3-甲基-1-丁醇、3-甲基-3-戊醇、環戊醇、1-己醇、2-己醇、3-己醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇、2-乙基-1-丁醇、2-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-1-戊醇、3-甲基-2-戊醇、3-甲基-3-戊醇、4-甲基-1-戊醇、4-甲基-2-戊醇、4-甲基-3-戊醇及環己醇，亦可單獨使用或使用此等組合之混合溶媒。

進而，基底膜形成劑中，除了上述共聚物與溶媒之外，因應必要，在不損及所得之基底膜的性能之範圍內，也能夠添加其他物質。作為其他物質，有舉出pH調整劑、交聯劑、防腐劑、界面活性劑、提高與容器或基板之密著性之促進劑、抗黴劑及糖類等。

【 0055】

[細胞培養之基底膜之製造方法、細胞培養容器之製造方法、細胞培養容器]

藉由將前述細胞培養之基底膜形成劑塗布於容器或基板之表面並乾燥，能夠製造細胞培養之基底膜、包含該基底膜之細胞培養容器。於此，「表面」意指與細胞或細胞培養液等內容物接觸之面。

作為容器或基板，有舉例如一般細胞之培養中所使用之培養皿、組織培養用培養盤、多用性培養盤等之細胞培養皿或培養盤、細胞培養燒瓶、攪拌式燒瓶等之燒瓶、塑膠包袋、Teflon(註冊商標)包袋、培養包袋等之包袋、微盤、微孔盤、多用性盤、多用性孔盤等之盤、細胞培養玻片、管子、托盤、轉瓶等之瓶罐等。較佳為有舉出細胞培養皿或培養盤、盤子、托盤。

【0056】且，容器或基板之材質能夠舉例如玻璃、金屬、含金屬之化合物或含半金屬之化合物、活性碳或樹脂。金屬有舉出典型金屬：(鹼金屬：Li、Na、K、Rb、Cs；鹼土類金屬：Ca、Sr、Ba、Ra)、鎂族元素：Be、Mg、Zn、Cd、Hg；鋁族元素：Al、Ga、In；稀土類元素：Y、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu；錫族元素：Ti、Zr、Sn、Hf、Pb、Th；鐵族元素：Fe、Co、Ni；土酸元素：V、Nb、Ta、鉻族元素：Cr、Mo、W、U；錳族元素：Mn、Re；貴金屬：Cu、Ag、Au；鉑族元素：Ru、Rh、Pd、Os、Ir、Pt等。含金屬之化合物或含半金屬之化合物有舉例如基本成分為金屬氧化物且因高溫之熱處理而燒結

之燒結體之陶磁、如矽之半導體、金屬氧化物或半金屬氧化物(矽氧化物、氧化鋁等)、金屬碳化物或半金屬碳化物、金屬氮化物或半金屬氮化物(矽氮化物等)、金屬硼化物或半金屬硼化物等之無機化合物之成形體等之無機固體材料、鋁、鎳鈦、不銹鋼(SUS304、SUS316、SUS316L等)。

【0057】作為樹脂，亦可為天然樹脂或其衍生物，或合成樹脂之任一者，作為天然樹脂或其衍生物，較佳使用纖維素、三乙酸纖維素(CTA)、硝基纖維素(NC)、將葡聚糖硫酸固定化之纖維素等，作為合成樹脂，較佳使用聚丙烯腈(PAN)、聚酯系聚合物合金(PEPA)、聚苯乙烯(PS)、聚砜(PSF)、聚對苯二甲酸乙酯(PET)、聚甲基甲基丙烯酸酯(PMMA)、聚乙烯乙醇(PVA)、聚胺基甲酸酯(PU)、伸乙基乙烯醇(EVAL)、聚乙烯(PE)、聚酯、聚丙烯(PP)、聚氟化亞乙烯(PVDF)、聚醚砜(PES)、聚碳酸酯(PC)、聚氯乙烯(PVC)、聚四氟乙烯(PTFE)、超高分子量聚乙烯(UHPE)、聚二甲基矽氧烷(PDMS)、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯樹脂(ABS)或Teflon(註冊商標)。本發明之細胞培養容器之製造中，塗布聚合物使其存在容器或基板之表面上至少一部份時，不需要以高溫處理，也能夠適應耐熱性較低之樹脂等。

【0058】容器或基板之材質亦可為1種，亦可組合2種以上。此等之材質中，為單獨使用玻璃、矽、矽氧化物、聚苯乙烯(PS)、聚丙烯(PP)、聚醚砜(PES)、聚對苯二甲酸

乙酯(PET)、聚碳酸酯(PC)、聚氯乙烯(PVC)、Teflon(註冊商標)、環烯烴聚合物(COP)、聚二甲基矽氧烷(PDMS)或不銹鋼(SUS304、SUS316、SUS316L等)，或選自此等之組合較佳，為玻璃、聚苯乙烯(PS)、聚丙烯(PP)、不銹鋼(SUS304、SUS316、SUS316L等)、聚二甲基矽氧烷(PDMS)特別佳。

【0059】作為本案之細胞培養之基底膜形成劑之塗布方式，能夠使用例如噴墨法、網印法、縫塗布法、捲對捲轉印法等，較佳為以噴墨法或網印等之印刷技術來進行。

【0060】作為另外之塗布方法，為使用例如將該容器浸漬於上述基底膜形成劑、將基底膜形成劑添加於容器後再靜置特定時間，或將塗布劑塗布於容器或基板之表面等方法，但作為容器之一型態為細胞培養容器時，藉由將基底膜形成劑添加於容器，再靜置特定時間之方法來進行。添加能夠藉由使用例如注射器等添加容器之全容積之0.5至1倍量的基底膜形成劑來進行。靜置為因應容器或基板之材質或細胞培養之基底膜形成劑的種類，並適當地選擇時間或溫度來實施，例如以1分鐘至24小時，較佳為5分鐘至3小時，並於10至80℃下來實施。藉此，能夠在容器表面之至少一部份，較佳為遍布全體製造具有細胞培養之基底膜之細胞培養容器。

【0061】且，由相關之方法所得之容器或基板表面之細胞培養之基底膜能夠在使其與上述容器或基板表面之至少一部份接觸之步驟後，較佳為添加細胞培養之基底膜形

成劑，在靜置特定時間之步驟後，不經過乾燥步驟直接，或使用水或附著於細胞培養之試料之媒介(例如水、緩衝液、培養液等)來洗淨後，作為細胞培養容器來使用。

【0062】亦即，能夠在使其與上述容器或基板表面之至少一部份接觸之步驟後，較佳為添加細胞培養之基底膜形成劑，在靜置特定時間之步驟後，在48小時以內，較佳為24小時以內，更較佳為12小時以內，更較佳為6小時以內，更較佳為3小時以內，更較佳為1小時以內，不經過乾燥步驟直接，或使用水或附著於細胞培養之試料之媒介(例如水、緩衝液、培養液等，特別佳為培養液(例如DMEM培養液(Dulbecco modified Eagle培養液)))來洗淨後，作為細胞培養容器來使用。

【0063】容器亦可添附在乾燥步驟中。乾燥步驟為在大氣壓下或真空下，較佳為在溫度 -200°C 至 200°C 之範圍內進行。藉由乾燥步驟，且去除上述基底膜形成劑中之溶媒，完全固著於基體上。

【0064】基底膜例如以室溫(10°C 至 35°C ，較佳為 20°C 至 30°C ，例如 25°C)之乾燥也能夠形成，但為了迅速地使基底膜形成，亦可例如以 40°C 至 50°C 來乾燥。乾燥溫度若未滿 -200°C ，則必須要使用並非一般的冷媒，缺乏廣用性，且為了使溶媒昇華，必須要乾燥長時間，效率較差。乾燥溫度若超過 200°C ，則會產生聚合物之熱分解。再較佳乾燥溫度為 10°C 至 180°C ，再較佳乾燥溫度為 20°C 至 150°C 。

【0065】本案細胞培養之基底膜係經由以上簡單之步

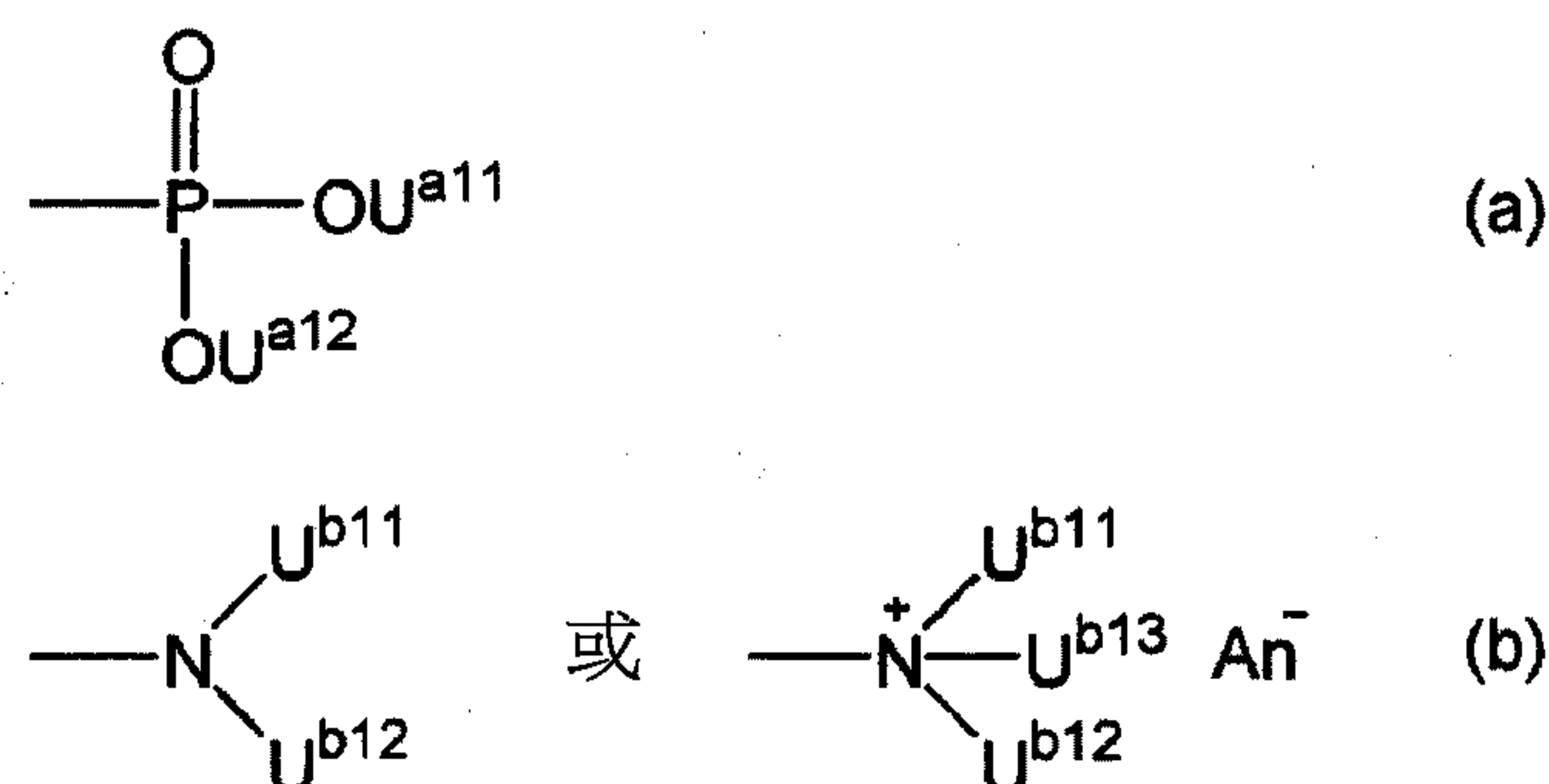
驟來製造。

且，為了清除殘存在細胞培養之基底膜的雜質、未反應單體等，亦可實施以選自水及包含電解質之水溶液中至少1種溶媒來洗淨之步驟。洗淨較期望為流水洗淨或超音波洗淨等。上述水及包含電解質之水溶液亦可為在例如40℃至95℃之範圍內加溫者。包含電解質之水溶液為PBS、生理食鹽水(僅包含氯化鈉)、Dulbecco磷酸緩衝生理食鹽水、Tris緩衝生理食鹽水、HEPES緩衝生理食鹽水及veronal緩衝生理食鹽水較佳，為PBS特別佳。固著後即使以水、PBS及乙醇等來洗淨，塗布膜也不會溶出，會依然強固地固著在基體上。

【0066】本案細胞培養之基底膜之膜厚之最大膜厚與最小膜厚為1~1000nm之範圍，較佳為5~500nm之範圍。

【0067】上述基底膜之塗布・乾燥步驟前，亦可為容器或基板亦可經細胞之附著抑制處理。具有細胞之附著抑制能之容器或基板能夠經由例如塗布具有公知之細胞之附著抑制能之塗布膜形成用組成物之步驟來製造。作為具有細胞之附著抑制能之塗布膜形成組成物，將包含下述共聚物與溶媒之塗布膜形成用組成物塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟較佳，該共聚物包含：包含下述式(a)表示之有機基之重複單位與包含下述式(b)表示之有機基之重複單位之共聚物，

【化 1 5】



[式中， U^{a11} 、 U^{a12} 、 U^{b11} 、 U^{b12} 及 U^{b13} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， An^- 表示選自鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子]。

【0068】碳原子數1至5之直鏈或分支烷基與上述相同。

上述塗布膜形成用組成物能夠使用例如WO2014/196650記載之塗布膜形成用組成物。

作為上述塗布膜形成用組成物之塗布方法，並無特別限定，能夠使用通常之旋轉塗布、浸塗布、溶液澆鑄法等之塗布法。

【0069】上述塗布膜之乾燥步驟為在大氣下或真空下，以溫度 -200°C 至 180°C 之範圍內來進行。藉由乾燥步驟，能夠去除上述塗布膜形成用組成物中之溶媒，同時上述共聚物之式(a)及式(b)彼此會形成離子鍵結，完全固著於基體上。

【0070】上述塗布膜在例如室溫(10°C 至 35°C ，例如 25°C)之乾燥下也能夠來形成，但為了更迅速地形成塗布

膜，亦可在例如40℃至50℃下使其乾燥。且，亦可使用以freeze-dry法之極低溫~低溫(-200℃乃至-30℃前後)之乾燥步驟。freeze-dry被稱作真空凍結乾燥，是一種通常將欲使其乾燥者藉由冷媒來冷卻，在真空狀態下將溶媒以昇華來去除之方法。freeze-dry所使用之一般冷媒有舉出乾冰與甲醇之混合溶媒(-78℃)、液態氮(-196℃)等。

【0071】乾燥溫度若在-200℃以下，則必須要使用並非一般的冷媒，缺乏廣用性，且為了使溶媒昇華，必須要乾燥長時間，效率較差。乾燥溫度若在200℃以上，則塗布膜表面之離子鍵結反應會過度反應，該表面會失去親水性，無法揮發生體物質附著抑制能。再較佳之乾燥溫度為10℃至180℃，再較佳之乾燥溫度為25℃至150℃。

【0072】乾燥後，為了清除殘存在該塗布膜上之雜質、未反應單體等，進一步為了調解膜中之共聚物之離子平衡，期望以選自水及包含電解質之水溶液中1種以上之溶媒並藉由流水洗淨或超音波洗淨等來洗淨。上述水及包含電解質之水溶液亦可為在例如40℃至95℃之範圍內加溫者。包含電解質之水溶為PBS、生理食鹽水(僅包含氯化鈉)、Dulbecco's磷酸緩衝生理食鹽水、Tris緩衝生理食鹽水、HEPES緩衝生理食鹽水及veronal緩衝生理食鹽水較佳，為PBS特別佳。固著後即使以水、PBS及乙醇等來洗淨，塗布膜也不會溶出，依然強固地固著於基體上。形成後之塗布膜即使有生體物質附著，之後也能夠容易地以水洗等來去除，形成有上述塗布膜之基體表面具有生體物質

之附著抑制能。

上述塗布膜之膜厚較佳為5~1000nm，更較佳為5~500nm。

【0073】且，作為上述細胞培養容器，亦可使用市售之已經過細胞低接著處理之細胞培養盤、具有細胞之附著抑制能細胞培養器，能夠使用例如特開2008-61609號公報記載之細胞培養容器，但不限定於此。

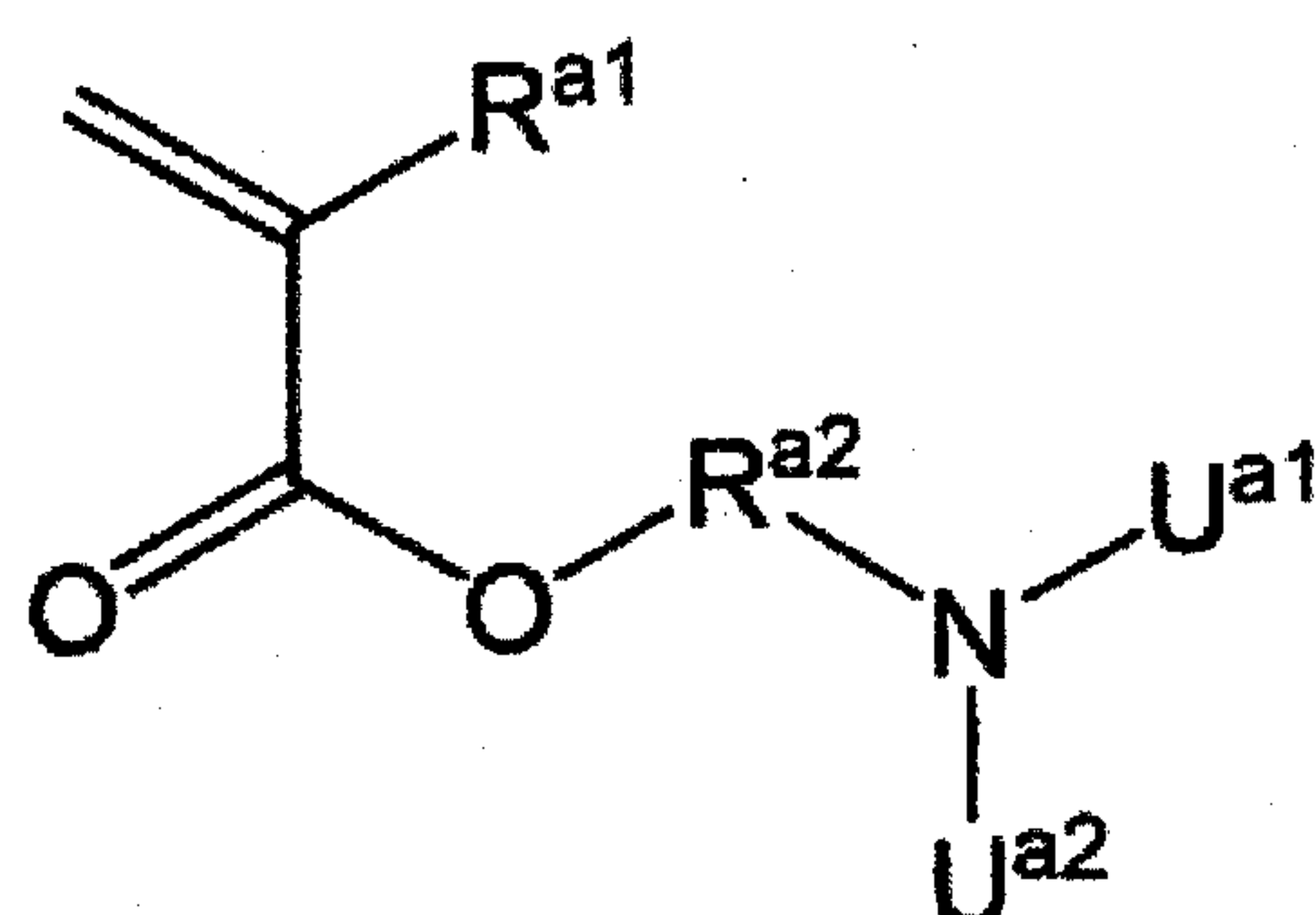
【0074】具有細胞之附著抑制能意指相較於沒有藉由例如WO2016/093293之實施例記載之方法所進行之螢光顯微鏡之塗布膜，且沒有細胞低吸著處理時，其相對吸光度(WST O.D.450nm)(%)((實施例之吸光度(WST O.D.450nm))/(比較例之吸光度(WST O.D.450nm)))為50%以下，較佳為30%以下，更較佳為20%以下。

【0075】

[細胞凝集塊之製造方法]

本案之細胞凝集塊之製造方法，其係在由包含來自下述式(I)表示之單體之單位之聚合物所得之細胞培養之基底膜上，以其本身公知之方法，例如實施例記載之方法來進行之細胞凝集塊之製造方法，

【化16】



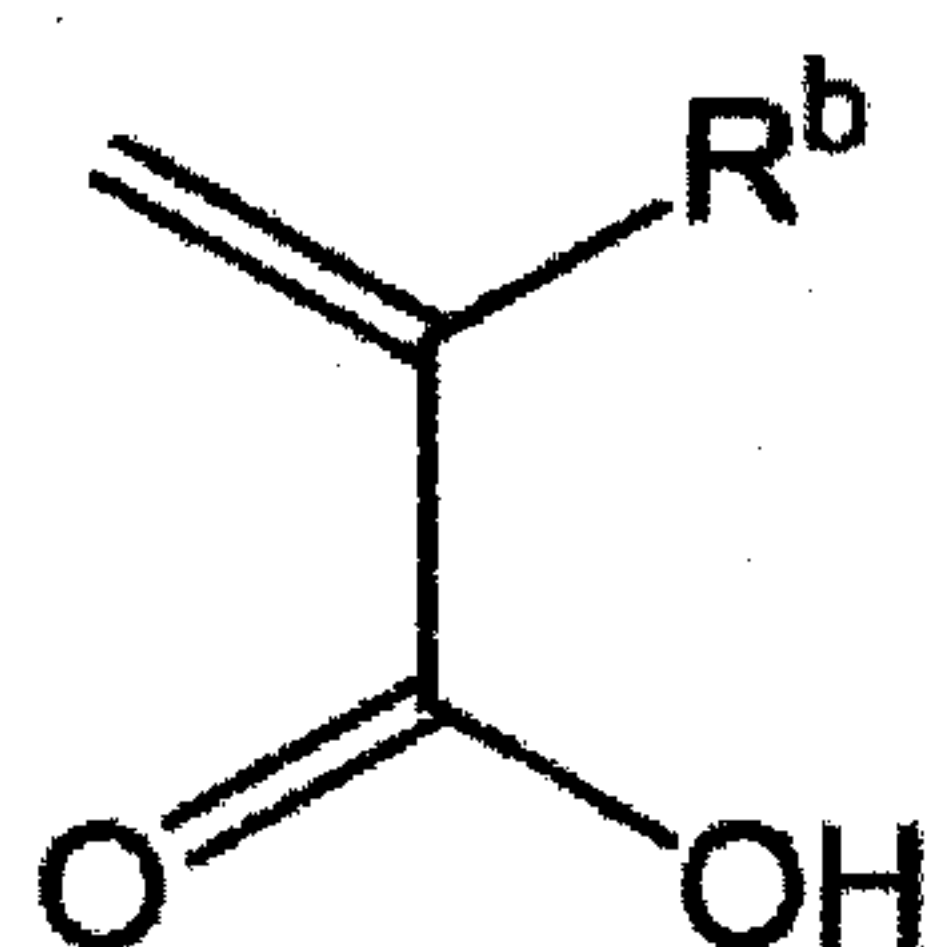
(I)

【0076】[式中， U^{a1} 、 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a1} 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a2} 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

上述細胞培養之基底膜為包含來自式(I)表示之單體之單位與來自下述式(II)表示之單體之單位之共聚物所得之基底膜較佳，

【0077】

【化17】



(II)

[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

[實施例]

【0078】以下舉出實施例進一步詳細並具體地說明本發明，但本發明不限定於此等。

【0079】

<分子量之測定方法>

下述合成例所示之重量平均分子量為 Gel Filtration Chromatography(以下簡稱為 GFC)所得之結果。

(測定條件)

- ・裝置：HLC-8320GPC(TOSOH(股)製)
- ・GFC管柱：TSKgel G6000+3000PWXL-CP
- ・流速：1.0ml/min
- ・溶離液：含鹽之水/有機混合溶媒
- ・管柱溫度：40℃
- ・測出器：RI
- ・注入濃度：聚合物固形分0.05質量%
- ・注入量：100μL
- ・測量線：三次近似曲線
- ・標準試料：聚氧化乙烯(Agilent公司製)×10種

【0080】

<合成例1> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(1)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)9.00g中添加四氫呋喃27.04g充分地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g一邊保持在20℃以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶

液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性同元聚合物(收量：6.4g，收率：71%)。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為250,000，多分散度為2.0(合成例聚合物1)。

【0081】

<合成例2> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(2)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)9.00g中添加四氫呋喃37.10g充份地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.02g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.26g一邊保持在 20°C 以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物(收

量：6.6g，收率：71%)。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為24,000，多分散度為2.0(合成例聚合物2)。

【0082】

<合成例3> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(3)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g中添加四氫呋喃41.94g充份地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.48g一邊保持在20℃以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之1.0μm過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物(收量：7.3g，收率：69%)。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為290,000，多分散度為1.9(合成例聚合物3)。

【0083】

<合成例4> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使

用之聚合物之製造(4)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)9.00g中添加四氫呋喃38.26g充分地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.02g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.55g一邊保持在20℃以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之1.0μm過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物(收量：7.2g，收率：75%)。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為250,000，多分散度為1.9(合成例聚合物4)。

【0084】

<合成例5> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(5)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)9.00g中添加四氫呋喃41.00g充分地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和

光純藥(股)製)0.02g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)1.23g一邊保持在20℃以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之1.0 μ m過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物(收量：5.8g，收率：57%)。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為270,000，多分散度為2.1(合成例聚合物5)。

【0085】

<合成例6> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(6)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)9.00g中添加四氫呋喃44.58g充份地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.03g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)2.11g一邊保持在20℃以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一

邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物(收量：9.6g，收率：86%)。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為270,000，多分散度為2.4(合成例聚合物6)。

【0086】

<合成例7> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(7)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g中添加四氫呋喃41.94g充份地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.48g、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(n =約4)(東京化成工業(股)製)0.21g一邊保持在 20°C 以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，

並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為660,000，多分散度為3.8(合成例聚合物7)。

【0087】

<合成例8> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(8)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g中添加乙醇43.30g充份地溶解。接著，將二甲基1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.31g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.48g一邊保持在 20°C 以下，添加於上述乙醇溶液中。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，

藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物。
GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為88,000，多分散度為2.4(合成例聚合物8)。

【0088】

<合成例9> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(9)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g中添加四氫呋喃41.94g充份地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.48g一邊保持在20℃以下，一邊添加於上述四氫呋喃溶液。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至60℃。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之1.0μm過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為140,000，多分散度為2.5(合成例聚合物9)。

【0089】

<合成例 10> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(10)

於甲基丙烯酸 2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g 中添加乙醇 31.46g 充份地溶解。接著，將二甲基 1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.48g 一邊保持在 20℃ 以下，添加於上述乙醇溶液中。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境 24 小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析 72 小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 1.0 μ m 過濾器(AS ONE 公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物。GFC 所得之此聚合物之重量平均分子量為 770,000，多分散度為 4.1(合成例聚合物 10)。

【 0090 】

<合成例 11> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(11)

於甲基丙烯酸 2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g 中添加乙醇 43.90g 充份地溶解。接著，將二甲基

1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)0.97g一邊保持在20℃以下，添加於上述乙醇溶液中。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之1.0μm過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為660,000，多分散度為3.6(合成例聚合物11)。

【0091】

<合成例12> 作為熱聚合之細胞培養之基底膜形成劑來使用之聚合物之製造(10)

於甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g中添加乙醇70.00g充分地溶解。接著，將二甲基1,1'-偶氮雙(1-環己烷羧酸酯)(VE-073、富士薄膜和光純藥(股)製)0.01g、甲基丙烯酸(東京化成工業(股)製)2.35g一邊保持在20℃以下，添加於上述乙醇溶液中。將流入有充分地攪拌成均勻之上述所有成份之混合液添加於附有冷卻

管之三口燒瓶，並流入氮，一邊攪拌一邊升溫至回流溫度。藉由以維持上述環境24小時之狀態來加熱攪拌，得到作為反應生成物之聚合物。將反應生成物以貧溶媒之己烷再沉澱，藉由過濾析出物來回收，並使其減壓乾燥。使所得之粉體溶解於純水中，將溶液移至透析管。進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到溫度應答性聚合物。GFC所得之此聚合物之重量平均分子量為570,000，多分散度為3.6(合成例聚合物12)。

【0092】

<比較合成例1> 光聚合之聚合物之製造(1)

於容量30mL之軟質玻璃製之透明玻璃小藥瓶中添加甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g及水500 μL ，充分攪拌使其均勻。之後，藉由對此混合物(液體)清洗氮氣15分鐘，將此混合物去氧。

之後，對此反應物使用高壓水銀燈(USHIO公司製，型號：UM-102)，調整距離使照度計中365nm之照度成為 $0.1\text{mW}/\text{cm}^2$ ，並以約 25°C 照射19小時紫外線，使上述反應物聚合。反應物在5小時後會帶有黏性，在18小時後會固化(膠化)，得到作為反應生成物之聚合物。此反應生成物對2-丙醇為難溶性，僅將一部份溶解之部份移至於透析管。且溶解液為牽絲黏性體且操作困難。之後，進行透析

72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到比較合成例聚合物1(收量：1.5g，收率：15%)。

【0093】

<比較合成例2> 光聚合之聚合物之製造(2)

於容量30mL之軟質玻璃製之透明玻璃小藥瓶中添加甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g及水1000 μL ，充分攪拌使其均勻。之後，藉由對此混合物(液體)清洗氮氣15分鐘，將此混合物去氧。

之後，對此反應物使用高壓水銀燈(USHIO公司製，型號：UM-102)，調整距離使照度計中365nm之照度成為 $0.1\text{mW}/\text{cm}^2$ ，並以約 25°C 照射19小時紫外線，使上述反應物聚合。反應物在5小時後會帶有黏性，在18小時後會固化，得到作為反應生成物之聚合物。此反應生成物對2-丙醇為難溶性，僅將一部份溶解之溶液移至於透析管。且溶解液為牽絲黏性體且操作困難。之後，進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之 $1.0\mu\text{m}$ 過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到比較合成例聚合物2(收量：2.6g，收率：26%)。

【0094】

<比較合成例3> 光聚合之聚合物之製造(3)

於容量30mL之軟質玻璃製之透明玻璃小藥瓶中添加甲基丙烯酸2-(二甲基胺基)乙酯(東京化成工業(股)製)10.00g及水500 μ L，充分攪拌使其均勻。之後，藉由對此混合物(液體)清洗氮氣15分鐘，將此混合物去氧。

之後，對此反應物使用高壓水銀燈(USHIO公司製，型號：UM-102)，調整距離使照度計中365nm之照度成為0.1mW/cm²，並以約25℃照射19小時紫外線，使上述反應物聚合。反應物在5小時後會帶有黏性，在18小時後會固化，得到作為反應生成物之聚合物。此反應生成物對2-丙醇為難溶性，僅將一部份溶解之溶液移至於透析管。且溶解液為牽絲黏性體且操作困難。之後，進行透析72小時，將反應生成物純化。

將包含反應生成物之溶液以玻璃纖維製之1.0 μ m過濾器(AS ONE公司製，型號：SYGF0605MNXX104)來濾過，藉由使所得之濾液凍結乾燥，得到比較合成例聚合物3(收量：3.3g，收率：33%)。

【0095】

<實施例1> (聚合物之¹H-NMR測定之組成解析)

將合成例聚合物1~12、比較合成例聚合物1~3之核磁共振光譜(NMR)使用核磁共振裝置(BRUKER公司製，型號：ASCEnd500)，並將重水(D₂O)作為標準物質來測定。下述表示合成例聚合物1~合成例聚合物6共通之代表性波峰。

【 0096 】 $^1\text{H-NMR}$ (in D_2O) δ 0.8-1.2 (br, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 1.6-2.0 (br, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$), 2.2-2.4 (br, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.5-2.7 (br, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.0-4.2 (br, $-\text{O}-\text{CH}_2-$)。

【 0097 】 於此，由主鏈之甲基 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$ (δ 0.8-1.2) 之質子數 (DMAEMA 之同元聚合物時，每單體 1 分子為 3 個) A 與側鏈之 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 基 (δ 4.0-4.2) 之甲基質子數 (DMAEMA 之同元聚合物時，每單體 1 分子為 2 個) B，算出側鏈所具有之胺基官能基數與側鏈之羧基之官能基數之比。

其結果，關於以熱聚合合成之合成例 1 至 12 之甲基丙烯酸 2-(二甲基胺基)乙酯 (以下簡稱為「DM」)/甲基丙烯酸 (以下簡稱為「MA」) 之組成比，合成例 1 時為 100/0，合成例 2 時為 95/5，合成例 3 時為 95/5，合成例 4 時為 88/12，合成例 5 時為 82/18，合成例 6 時為 76/24，合成例 7 時為 89/11，合成例 8~10 時為 92/8，合成例 11 時為 85/15，合成例 12 時為 70/30。關於以光聚合合成之比較合成例，比較合成例 1、2、3 中皆成為 99/1，較難控制 DM 與 MA 之比率。由上述結果來看，能夠確認藉由熱聚合所合成之聚合物中，相較於藉由光聚合所合成之聚合物，能夠控制 DM 與 MA 之比率，進而能夠以高收率得到聚合物。

將詳細結果表示於表 1。

【 0098 】 關於合成例 1~12 所合成之聚合物，重量平均分子量 M_w 之範圍能夠在 88,000~770,000 之廣泛範圍作區

分。且，分子量分布(PDI)之範圍會成為1.9~4.1，能夠從較小分布至較大分布來作區分。且，任一者聚合物都能不膠化地合成。另一方面，以光聚合合成本聚合物時，分子量之控制或將分子量分布控制在較小的區域較難。例如專利公報(專利第5746240號)中有記載以與比較合成例1相同方法合成時為PDI=3.0，以與比較合成例2相同方法合成時為PDI=4.3，以與比較合成例3相同方法合成時為PDI=7.4。且，光聚合在合成時，所有的聚合物都會膠化，不僅較難控制分子量，也較難控制反應本身。分子量分布若變得極大，則會有低分子量成分之溶出或高分子量成分之析出之虞。考慮此點而藉由使用熱聚合合成聚合物，相較於以光聚合合成時，能夠抑制分子量或分子量分布，同時安定地製造聚合物。

【0099】

【表1】

	添加比	組成比(NMR in D2O)	Mw (×10 ⁴)	Mw/Mn	製造法
	DM/MA	DM/MA			
合成例1	100/0	100/0	25	2.0	熱聚合
合成例2	95/5	95/5	24	2.0	
合成例3	92/8	95/5	29	1.9	
合成例4	90/10	88/12	25	1.9	
合成例5	80/20	82/18	27	2.1	
合成例6	70/30	76/24	27	2.4	
合成例7	92/8	89/11	66	3.8	
合成例8	92/8	92/8	9	2.4	
合成例9	92/8	92/8	14	2.5	
合成例10	92/8	90/10	77	4.1	
合成例11	85/15	81/19	66	3.6	
合成例12	70/30	74/26	57	3.6	
比較合成例1	DM+純水500μL	99/1	-	-	光聚合
比較合成例2	DM+純水1000μL	99/1	-	-	
比較合成例3	DM+純水5000μL	99/1	-	-	

【 0100 】**<實施例 2> 塗布膜之表面形狀測定**

將分子量相異之實施例聚合物 3、8 分別以滅菌水溶解成為 0.5mg/mL 之濃度，製造細胞培養之基底膜形成劑。使用噴墨裝置 (MICROJET 公司製，型號：LaboJet-600)，對經六甲基二矽氮烷處理之矽基板分別塗布 200nL。在室溫下乾燥 5 分鐘將膜硬化後，使用微細形狀測定機 ((股) 小坂研究所製，型號：ET-4000A)，測定塗布膜之表面形狀。測定條件為測定力 100 μ N，運送速度 0.05mm/sec。

合成例聚合物 3 ($M_w=290,000$) 在塗布膜之周邊部份堆積，內部會成為平坦之形狀。另一方面，也觀測到合成例聚合物 8 ($M_w=88,000$) 除了在塗布膜周邊部份堆積也會在中心部份堆積。藉由聚合物之分子量及分子量分布，得知塗布膜之剖面形狀也會有變化。

【 0101 】**<實施例 3> 細胞培養之基底膜形成劑製造用之聚合物水溶液之製造**

將合成例聚合物 1~合成例聚合物 12 分別以滅菌水溶解成為 1mg/mL 之濃度，製造聚合物水溶液 1~12。

【 0102 】**<實施例 4：細胞凝集塊製造試驗>****(4-1. 細胞低接著盤之調製)**

根據 WO2014/196650 之實施例 30 記載之製造方法，自含共聚物之清漆調製塗布溶液。將調製之塗布溶液添加於

12孔穴細胞培養盤(BD Biosciences公司製，#351143)之孔中使其成為500 μ L(固形分0.5質量%)/孔，在室溫下靜置1小時後，將過多的塗布溶液去除。使用烘箱(Advantec東洋(股)製，乾燥機FC-612)以50℃乾燥一晚。之後，在每1孔添加滅菌水500 μ L後，去除並進行洗淨。同樣地進行2次洗淨，以50℃乾燥一晚，得到細胞低接著盤。

【0103】

(細胞培養之基底膜形成劑之製造、作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物塗布盤之調製)

將由合成例聚合物3及合成例聚合物4所得之1mg/mL之聚合物水溶液以滅菌水稀釋成100 μ g/mL，製造細胞培養之基底膜形成劑3及4。將製造之聚合物水溶液以每滴1 μ L滴落於上述細胞低接著盤上，藉由於室溫乾燥30分鐘，得到使用於試驗且作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物塗布盤。

【0104】

(4-2. 細胞之調製)

細胞為使用來自人類骨髓之間葉系幹細胞(PromoCell公司製)。細胞之培養所使用之培養液為使用間葉系幹細胞增殖培養液 Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2(PromoCell公司製)。細胞在37℃/CO₂恆溫箱內以保持5%二氧化碳濃度之狀態下，使用直徑10cm之細胞培養皿(培養液10mL)靜置2天以上來培養。接著，將本細胞以HepesBSS溶液(PromoCell公司製)4ml洗淨後，添加胰蛋白

酶-EDTA溶液(PromoCell公司製)4mL，於室溫下靜置5分鐘。添加TrypsinNeutralizingSolution(PromoCell公司製)4mL，將細胞剝落並回收。將本懸浮液離心((股)TOMY精工製，型號LC-230、200×g/3分、室溫)後，清除上清，添加上述培養液，調製細胞懸浮液。

【0105】

(4-3. 細胞附著實驗)

對上述調製之盤中，各添加500μL細胞懸浮液，使其成為 $5.9 \times 10^5 \text{ cells/well}$ ($1.75 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$)。之後，以保持5%二氧化碳濃度之狀態下，於37℃ /CO₂恆溫箱內靜置3.5小時。靜置後，將非接著細胞與培養液去除，藉由以PBS洗淨，僅將接著細胞殘留在孔上。洗淨後，添加新培養液500μL/well，使用倒立型觀察顯微鏡IX73(Olympus(股)製)觀察接著細胞之情形並攝影。其結果如圖2所示，在塗布細胞培養之基底膜形成劑3、細胞培養之基底膜形成劑4之處，確認細胞之附著。

【0106】

(4-4. 細胞凝集塊之觀察)

將上述試驗之盤於37℃ /CO₂恆溫箱內中進而靜置1天。靜置後，使用倒立型觀察顯微鏡IX73(Olympus(股)製)，觀察細胞之情形。其結果如圖3所示，確認到將接著於細胞培養之基底膜形成劑3與細胞培養之基底膜形成劑4之細胞自盤剝落並凝集，形成細胞凝集塊(球狀)。因此，包含本案聚合物之基底膜顯示能夠用來作為細胞培養容器

之基底膜。

【0107】

<實施例5：細胞凝集塊製造試驗>

(5-1. 細胞培養之基底膜形成劑之製造及作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物塗布盤之調製)

將由合成例1、合成例10、合成例11及合成例12所得之1mg/mL之聚合物水溶液以滅菌水稀釋成50μg/mL，製造細胞培養之基底膜形成劑5、6、7及8。將製造之聚合物水溶液以每滴1μL滴落於細胞低接著培養盤(住友Bakelite公司製,#MS-9035X)上，藉由於50℃乾燥30分鐘，得到使用於試驗且作為細胞培養之基底膜來使用之聚合物塗布培養盤。

【0108】

(5-2. 細胞之調製)

細胞為使用來自人類骨髓之間葉系幹細胞(PromoCell公司製)。細胞之培養所使用之培養液為間葉系幹細胞增殖培養液 Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell公司製)。細胞在37℃/CO₂恆溫箱內以保持5%二氧化碳濃度之狀態下，使用直徑10cm之細胞培養皿(培養液10mL)培養2天以上。接著，將本細胞以HepesBSS溶液(PromoCell公司製)4ml洗淨後，添加胰蛋白酶-EDTA溶液(PromoCell公司製)4mL，於室溫下靜置5分鐘。添加 TrypsinNeutralizingSolution(PromoCell公司製)4mL，將細胞剝落並回收。將本懸浮液離心((股)TOMY精工製，

型號 LC-230，220×g/3分鐘，室溫)後，清除上清，添加上述培養液，調製細胞懸浮液。

【 0109】

(5-3. 細胞附著實驗)

對上述調製之盤中，添加細胞懸浮液，使其成為 $2.7 \times 10^6 \text{ cells/3 mL/dish}$ ($3 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$)。之後，以保持 5% 二氧化碳濃度之狀態下，於 37°C / CO_2 恆溫箱內靜置 2 小時。靜置後。去除非接著細胞與培養液，藉由以 PBS 洗淨，僅將接著細胞殘留於孔上。洗淨後，添加新培養液 2 mL/dish，使用 EVOS FL Auto (ThermoFisherScientific 公司製) 觀察接著細胞之情形並攝影。其結果如圖 4 所示，在塗布細胞培養之基底膜形成劑 5、細胞培養之基底膜形成劑 6、細胞培養之基底膜形成劑 7 及細胞培養之基底膜形成劑 8 之處，確認細胞之附著。

【 0110】

(5-4. 細胞凝集塊之觀察)

將上述試驗之盤接著使用 EVOS FL Auto 進行縮時攝影。縮時攝影為在 37°C / 5% CO_2 條件下將同一視野分別花 1 小時來攝影。其結果如圖 5 所示，將接著於細胞培養之基底膜形成劑 5、細胞培養之基底膜形成劑 6、基底膜形成劑 7 及基底膜形成劑 8 上之細胞自盤剝落並凝集，確認形成細胞凝集塊(球狀)。因此，包含本案聚合物之基底膜顯示能夠用來作為細胞培養容器之基底膜。

[產業之可利用性]

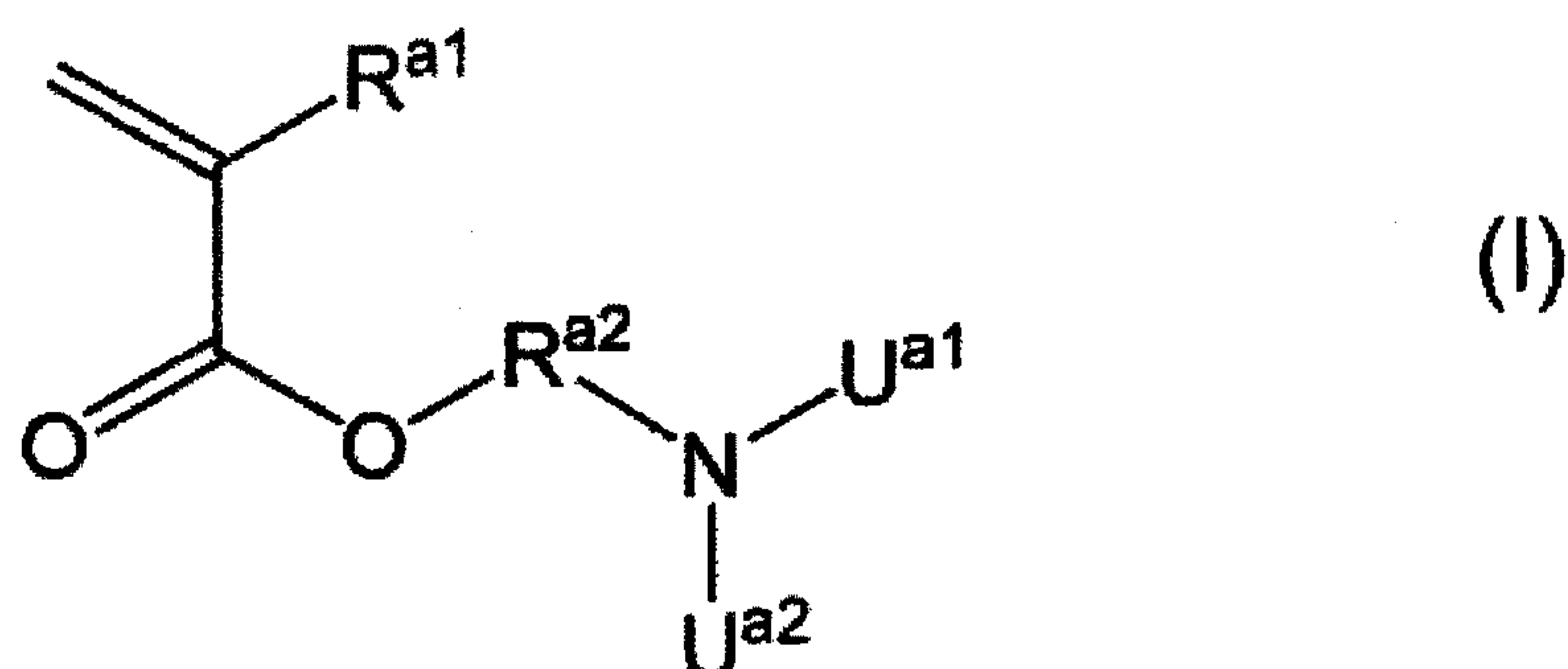
【0111】由本發明之製造方法所得之聚合物能夠作為細胞培養之基底膜形成劑來使用。使用本發明之基底膜形成劑，能夠製造細胞培養之基底膜、包含其之細胞培養容器。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種聚合物之製造方法，該聚合物作為細胞培養之基底膜來使用，該製造方法包含

調製包含下述式(I)表示之單體、自由基聚合起始劑及有機溶媒之混合物之調製步驟，及

將前述混合物升溫且攪拌，使單體聚合，調製聚合物之聚合步驟，



[式中，U^{a1}及U^{a2}各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，R^{a1}表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基，R^{a2}表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

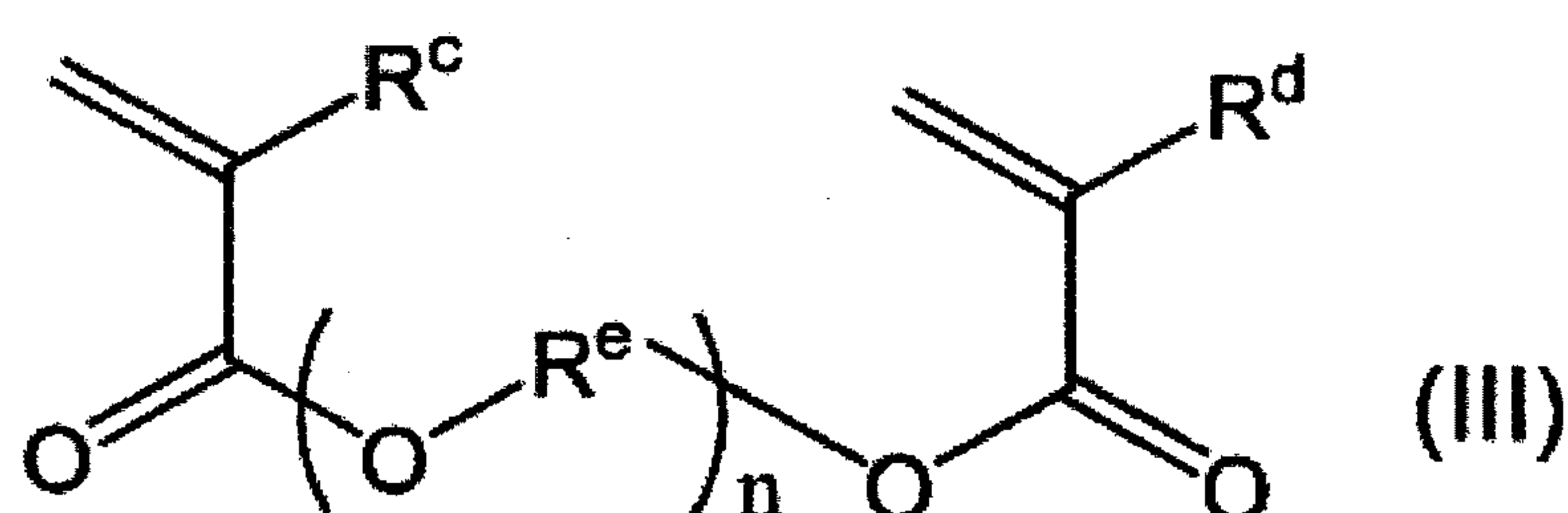
【請求項2】如請求項1之聚合物之製造方法，其中，進一步於上述混合物中包含式(II)表示之單體，



[式中，R^b表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

【請求項3】如請求項1或2之聚合物之製造方法，進一步於上述混合物中包含具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體。

【請求項4】如請求項3之聚合物之製造方法，其中，上述具有2個以上碳-碳不飽和鍵結之單體為下述式(III)表示之單體，



[式中， R^c 及 R^d 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^e 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基， n 表示1~50之數]。

【請求項5】如請求項1~4中任一項之聚合物之製造方法，其中，前述聚合物中之來自式(I)表示之單體之單位/來自式(II)表示之單體之單位之莫耳比為100/0~50/50。

【請求項6】如請求項1~5中任一項之聚合物之製造方法，其中，聚合物之重量平均分子量(M_n)為20,000~1,000,000，且聚合物之重量平均分子量(M_w)與前述數平均分子量(M_n)之比(M_w/M_n)為1.01~10.00。

【請求項7】如請求項1~6中任一項之聚合物之製造方法，其中，該聚合物係使用於作為用來使細胞接著後使其剝離，且得到細胞凝集塊之細胞培養之基底膜。

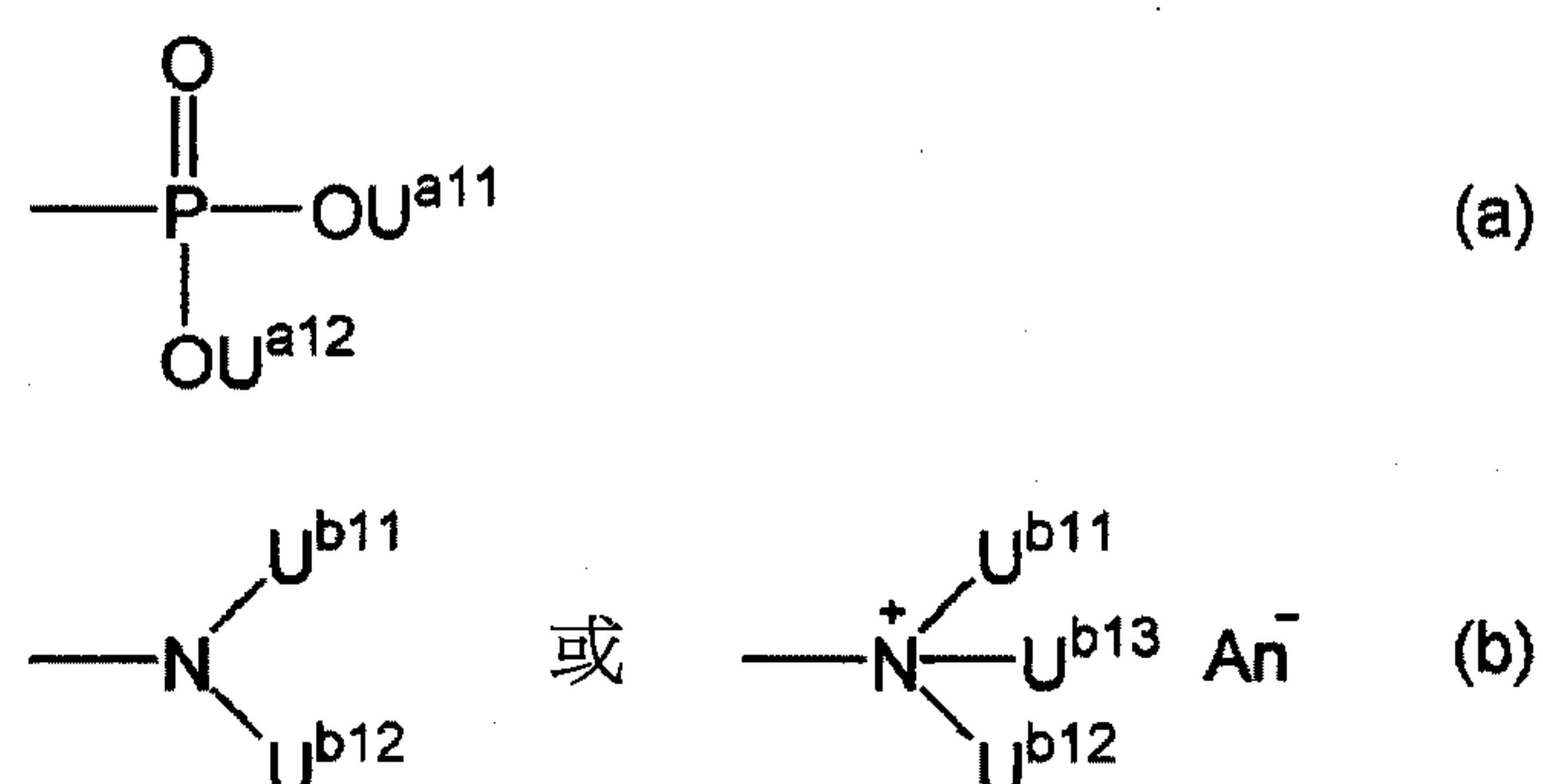
【請求項8】一種細胞培養之基底膜形成劑之製造方

法，其係包含混合由如請求項1~7中任一項之製造方法所得之聚合物與含水溶液之步驟。

【請求項9】一種細胞培養之基底膜之製造方法，其係將由如請求項8之製造方法所得之細胞培養之基底膜形成劑塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟。

【請求項10】如請求項9之細胞培養之基底膜之製造方法，其中，於上述塗布·乾燥步驟之前，進一步包含將包含下述共聚物與溶媒之塗布膜形成用組成物塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟，

該共聚物包含：包含下述式(a)表示之有機基之重複單位與包含下述式(b)表示之有機基之重複單位，



[式中， U^{a11} 、 U^{a12} 、 U^{b11} 、 U^{b12} 及 U^{b13} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， An^- 表示選自鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子]。

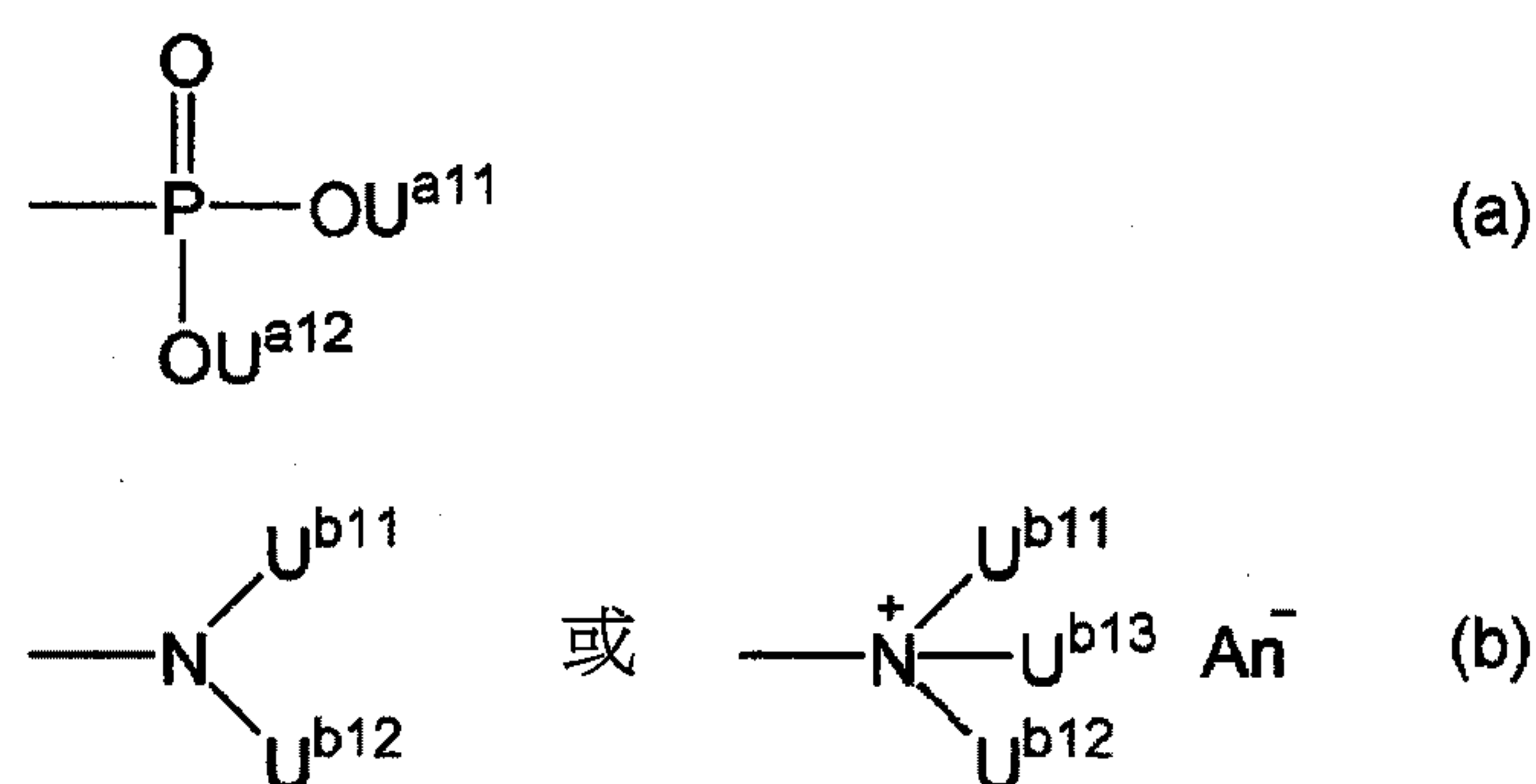
【請求項11】如請求項9之細胞培養之基底膜之製造方法，其中，上述容器或基板具有細胞之附著抑制能。

【請求項12】一種細胞培養容器之製造方法，其中，包含將由如請求項8之製造方法所得之細胞培養之基底膜

形成劑塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟。

【請求項 13】如請求項 12 之細胞培養容器之製造方法，其中，於上述塗布·乾燥步驟之前，進一步包含將包含下述共聚物與溶媒之塗布膜形成用組成物塗布於容器或基板之表面並乾燥之步驟，

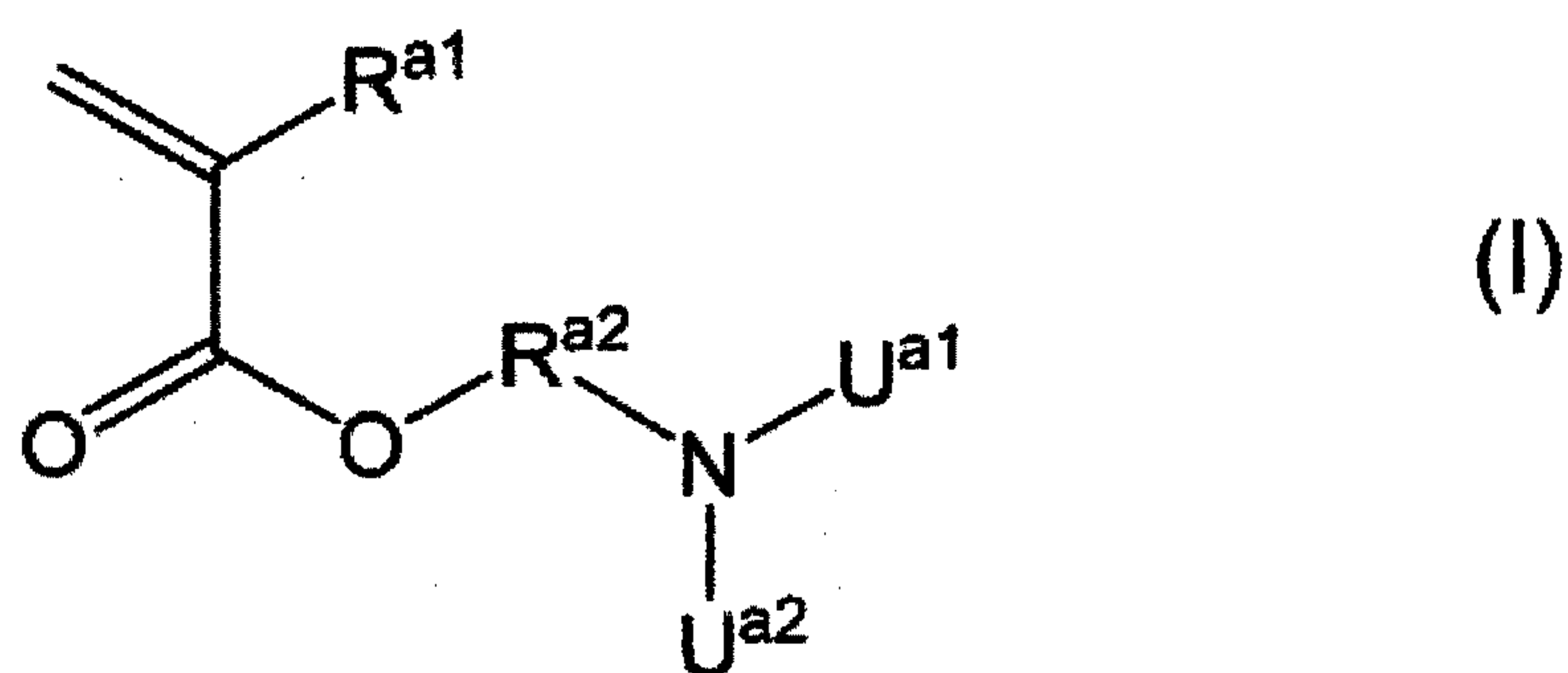
該共聚物包含：包含下述式 (a) 表示之有機基之重複單位與包含下述式 (b) 表示之有機基之重複單位，



[式中， U^{a11} 、 U^{a12} 、 U^{b11} 、 U^{b12} 及 U^{b13} 各自獨立表示氫原子或碳原子數 1 至 5 之直鏈或分支烷基， An^- 表示選自鹵化物離子、無機酸離子、氫氧化物離子及異硫氰酸鹽離子所成群之陰離子]。

【請求項 14】如請求項 12 之細胞培養容器之製造方法，其中，上述容器或基板為具有細胞之附著抑制能。

【請求項 15】一種細胞凝集塊之製造方法，其係將包含來自下述式 (I)：表示之單體之單位之聚合物作為細胞培養之基底膜來使用，



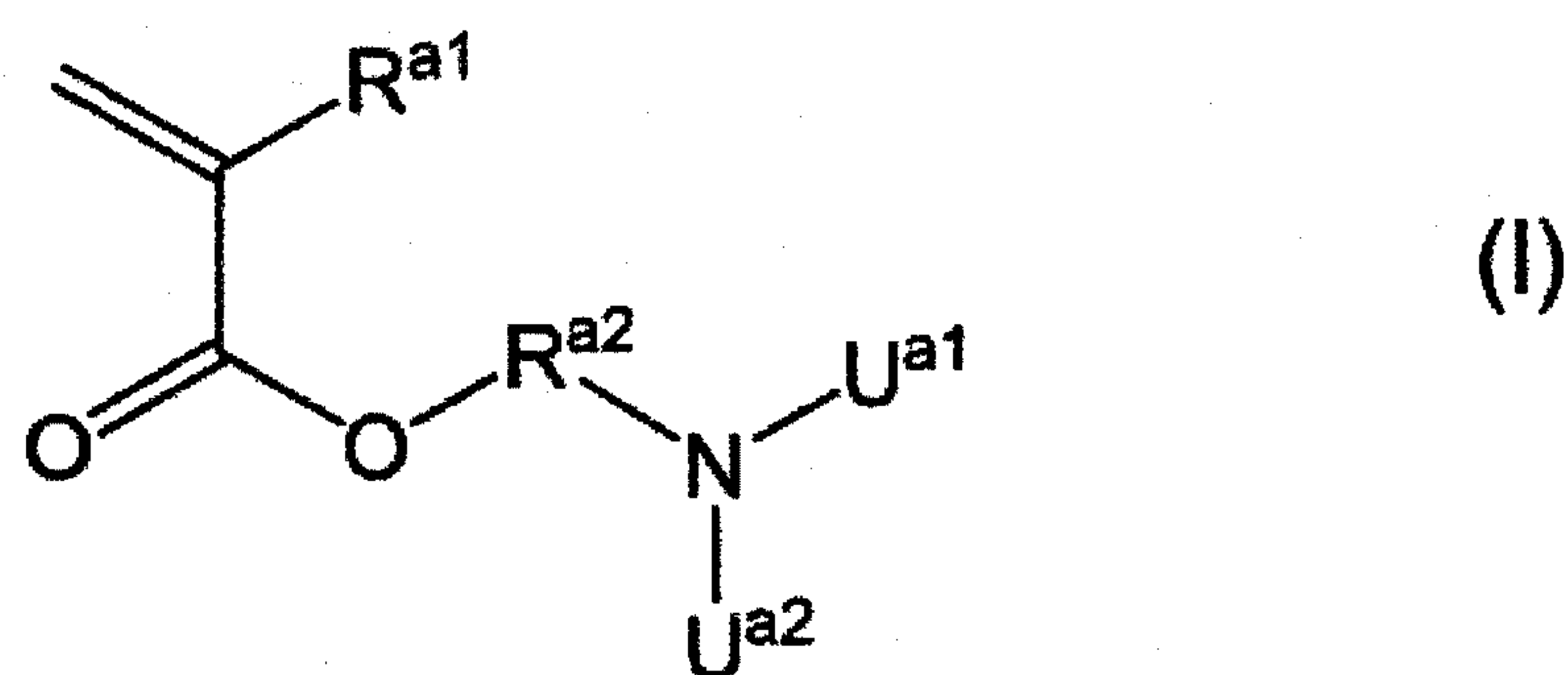
[式中， U^{a1} 及 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a1} 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a2} 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

【請求項16】如請求項15之細胞凝集塊之製造方法，其中，上述聚合物為進一步包含來自式(II)表示之單體之單位之共聚物，



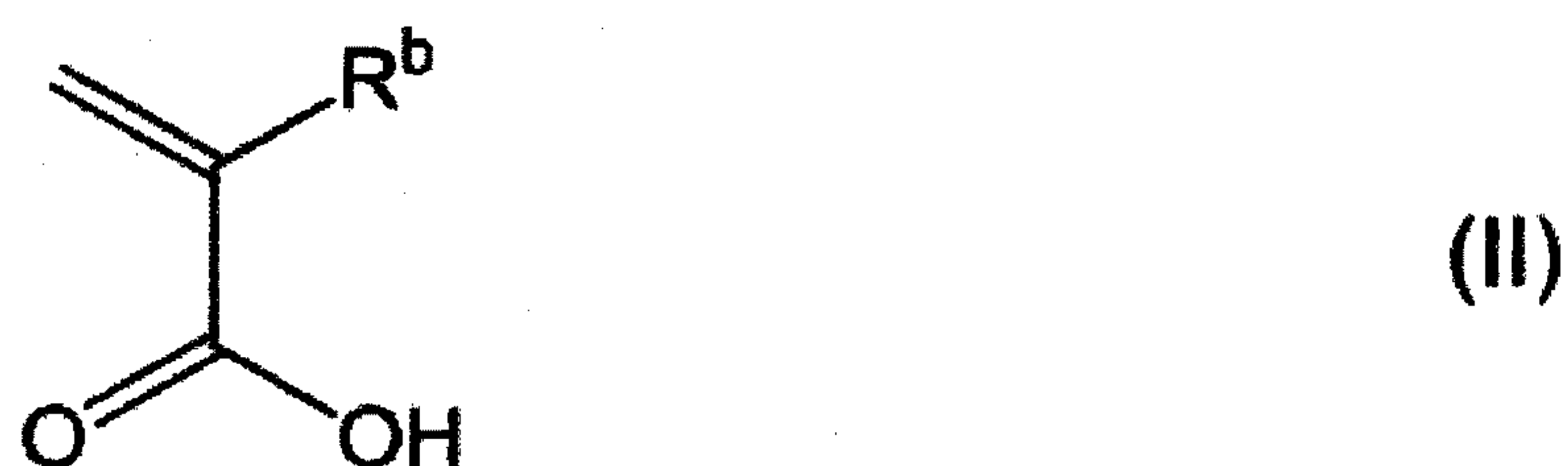
[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

【請求項17】一種包含來自下述式(I)表示之單體之單位之聚合物之使用，其係作為用來使細胞接著後使其剝離，且得到細胞凝集塊之細胞培養之基底膜，



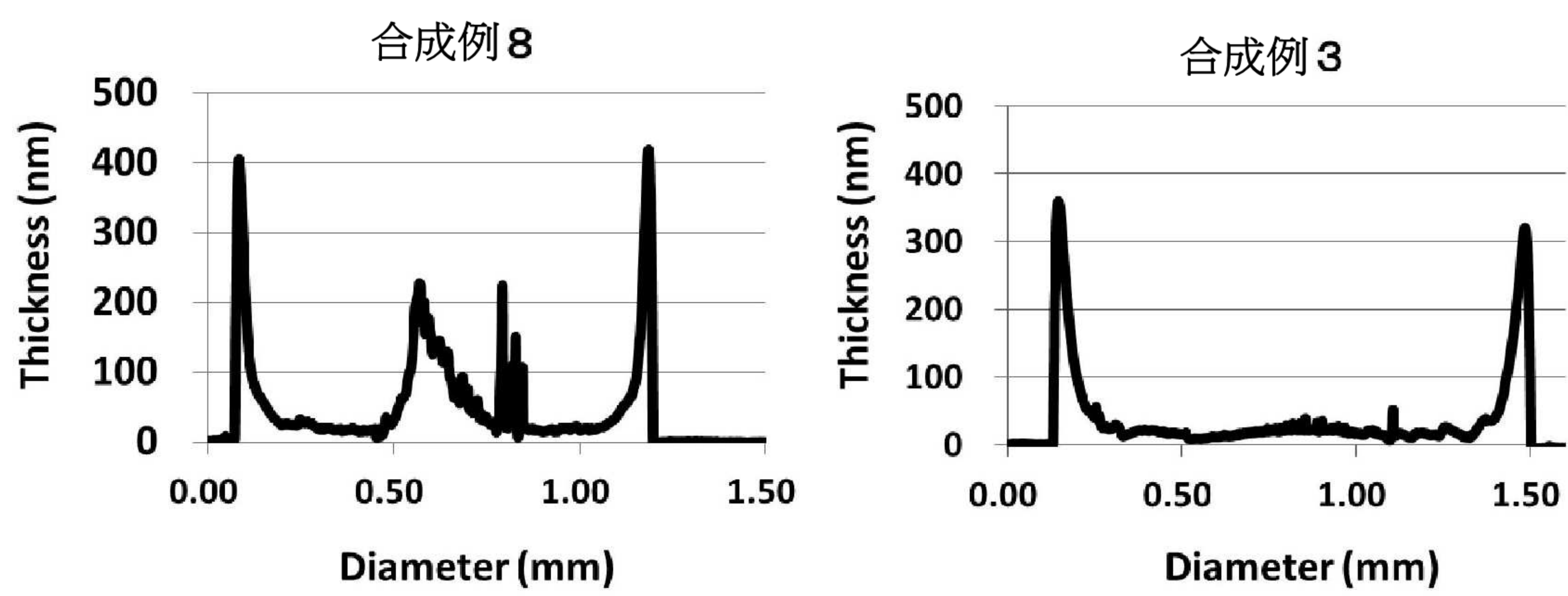
[式中， U^{a1} 及 U^{a2} 各自獨立表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a1} 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基， R^{a2} 表示碳原子數1至5之直鏈或分支伸烷基]。

【請求項18】如請求項17之使用，其係作為用來使細胞接著後使其剝離，且得到細胞凝集塊之細胞培養之基底膜，其中，上述聚合物為進一步包含來自上述式(I)與式(II)表示之單體之單位之共聚物，

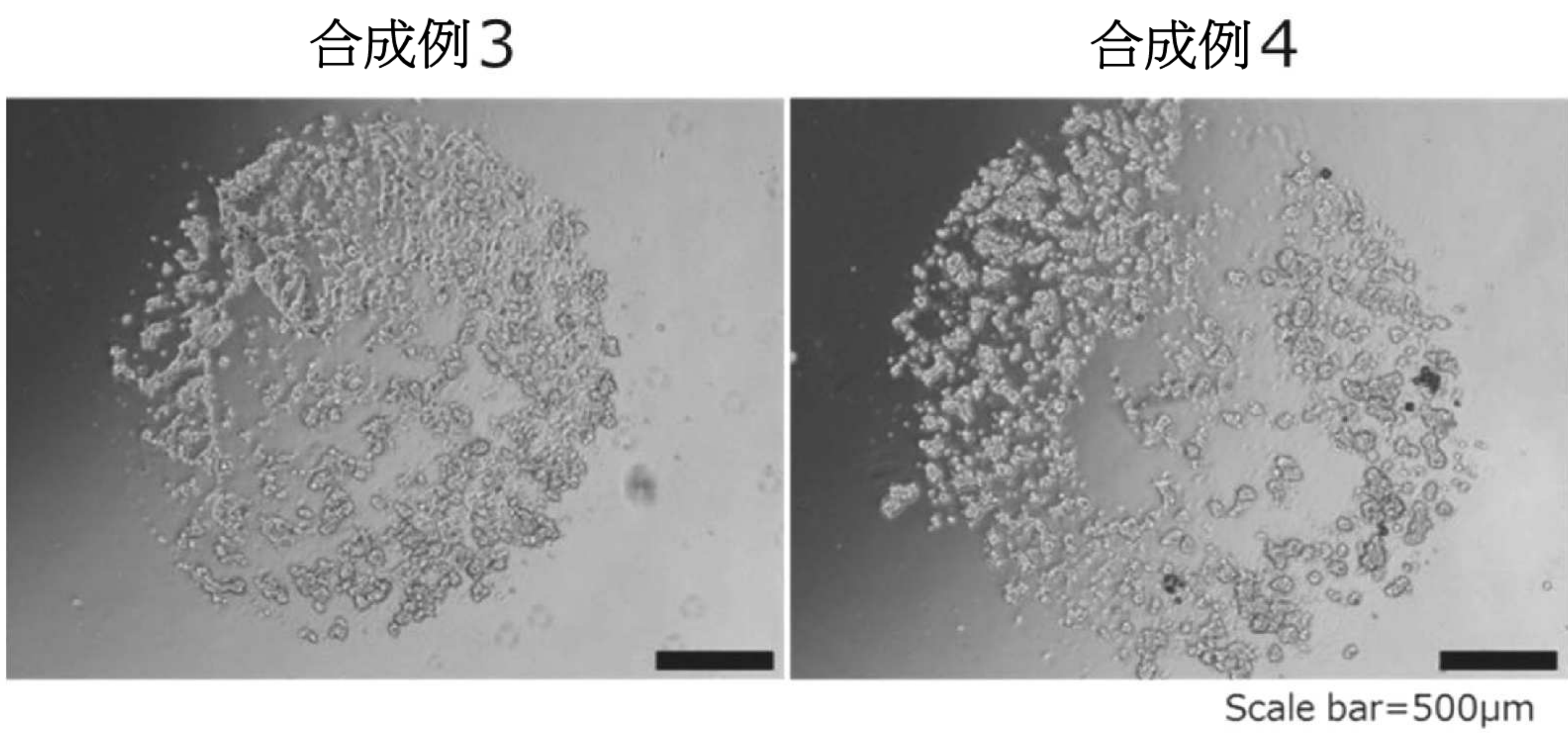


[式中， R^b 表示氫原子或碳原子數1至5之直鏈或分支烷基]。

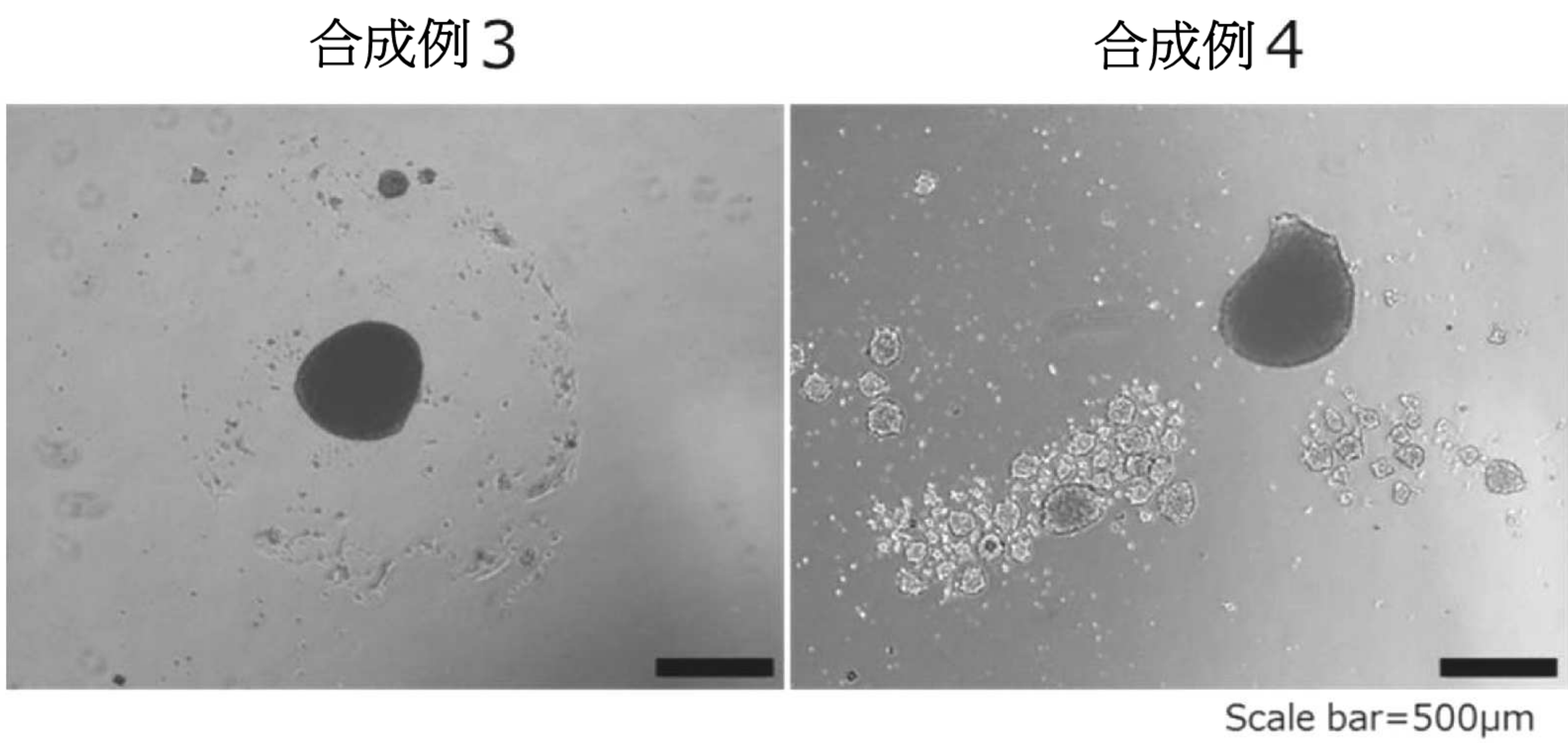
【發明圖式】



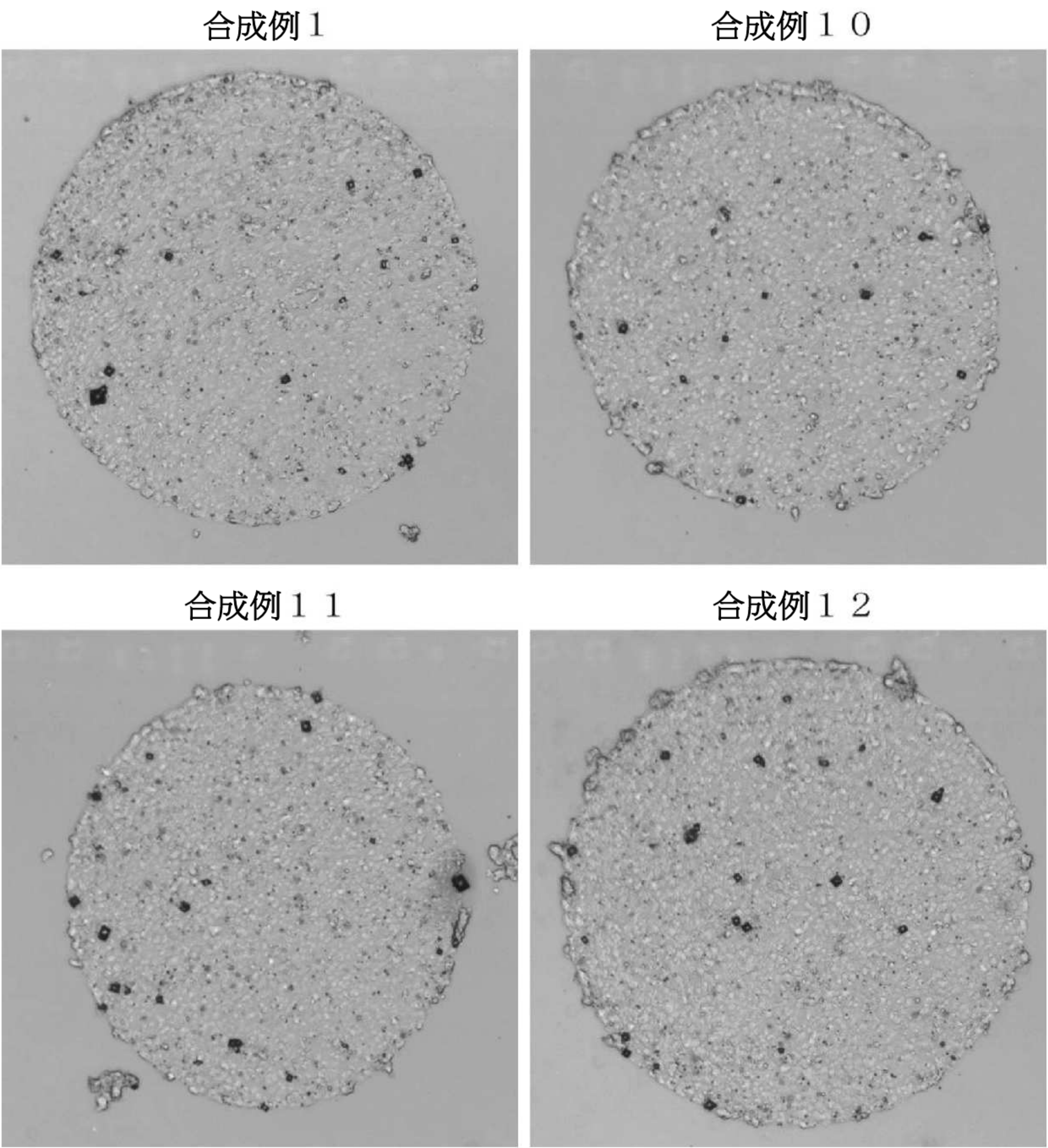
【圖 1】



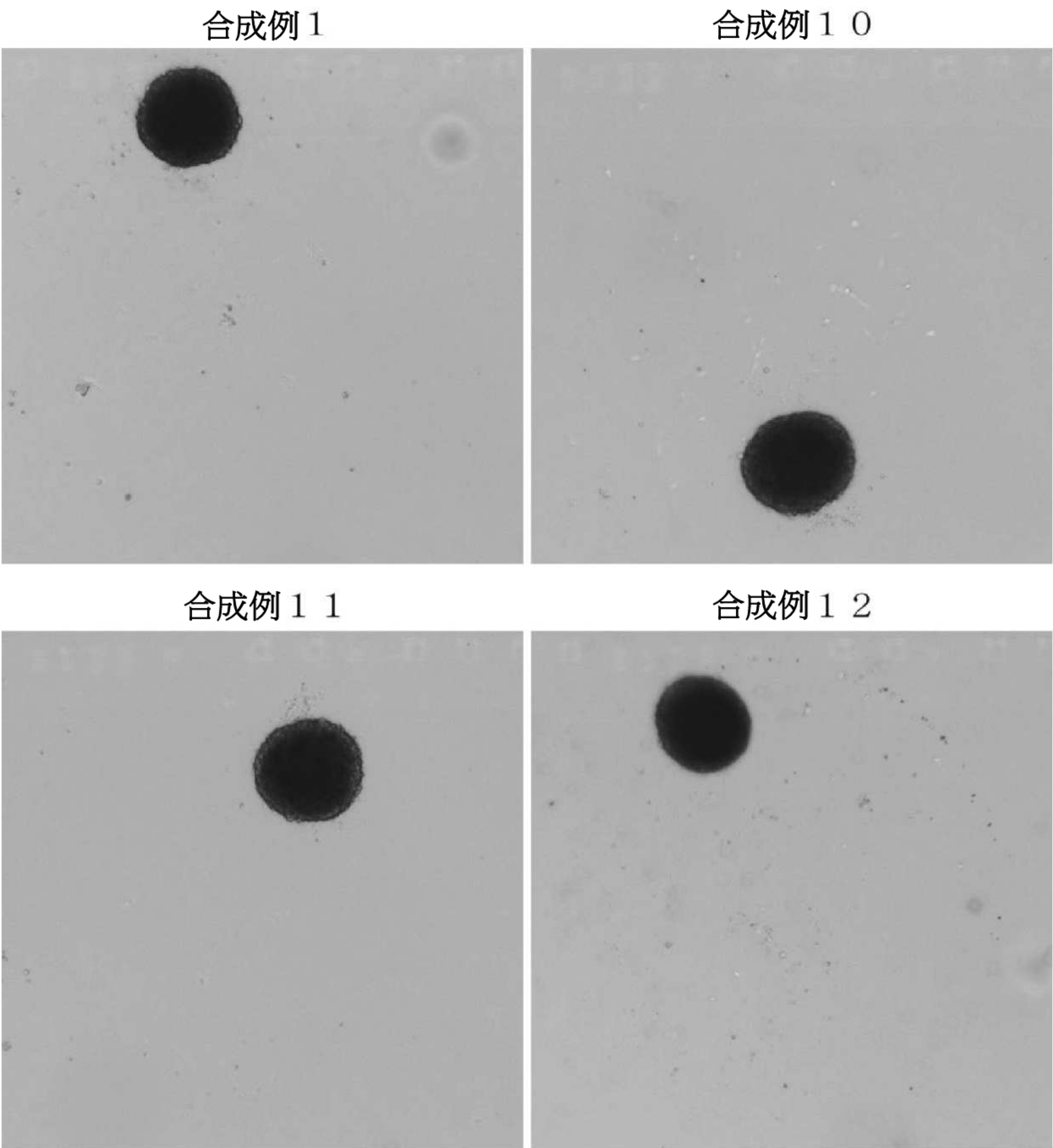
【圖 2】



【圖 3】



【圖 4】



【圖 5】