

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 599**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C08F 8/28 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2018 PCT/JP2018/048386**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2019 WO19131978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2018 E 18893713 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3733834**

54 Título: **Material de andamiaje para cultivos de células madre y método de cultivo de células madre usando el mismo**

30 Prioridad:

27.12.2017 JP 2017252420

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2024

73 Titular/es:

**SEKISUI CHEMICAL CO., LTD. (100.0%)
4-4, Nishitemma 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka530-8565, JP**

72 Inventor/es:

**HANEDA, SATOSHI;
MANABE, YURIKO;
ISHII, RYOMA;
IGUCHI, HIROKI;
YAMAUCHI, HIROSHI y
OMURA, TAKAHIRO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 966 599 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Material de andamiaje para cultivos de células madre y método de cultivo de células madre usando el mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un material de andamiaje para el cultivo de células madre tal como se define en la reivindicación 1 y a un método de cultivo de células madre tal como se define en la reivindicación 7.

10 **Antecedentes de la técnica**

Se espera que las células madre se apliquen al descubrimiento de fármacos y a la medicina regenerativa. Las células madre son células que tienen potencia de autorrenovación y potencia de diferenciación, incluyendo células madre pluripotentes que pueden diferenciarse en todos los tipos de células, y células madre tisulares y células progenitoras de tejido que pueden diferenciarse sólo en tipos de células constituyentes del tejido corporal en la misma serie. Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre pluripotentes humanas (hPSC), tales como células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotentes inducidas por humanos (hiPSC). Es una tecnología básica esencial para cultivar y proliferar células madre de manera segura y con buena reproducibilidad para la aplicación médica de estas células. En particular, para una aplicación industrial en medicina regenerativa, es necesario manipular una gran cantidad de células madre en estado indiferenciado. Por consiguiente, se han realizado amplios estudios sobre técnicas para la proliferación de células madre usando macromoléculas y células alimentadoras naturales y sintéticas, y manteniendo la pluripotencia (o multipotencia). En particular, se sabe que la fijación celular después de la siembra es extremadamente alta cuando se usa como polímero natural una proteína adhesiva tal como laminina o vitronectina, o Matrigel derivada de sarcoma de ratón.

Sin embargo, existen problemas porque los polímeros naturales son costosos debido a su muy baja productividad, pueden observarse variaciones entre lotes porque son sustancias que se producen de manera natural y existen preocupaciones de seguridad debido a los componentes de origen animal.

Para resolver los problemas anteriores, se ha propuesto un portador de resina para cultivo de células madre que usa una resina sintética. Por ejemplo, la columna de ejemplos en el documento de patente 1 da a conocer un compuesto de polivinilacetato que tiene un grado de acetalización del 20 al 60 % en mol para proporcionar un andamiaje que tenga excelente hidrofiliia y resistencia al agua en el cultivo de fibroblastos de ratón. La columna de ejemplos en el documento de patente 2 da a conocer un hidrogel que se compone de un polímero acrílico en el cultivo de células ES de ratón. La columna de ejemplos en el documento de patente 3 describe un gel de polirotaxano hidrófilo y flexible en el cultivo de células iPS de ratón.

40 **Documento de la técnica relacionada**40 **Documento de patente**

Documento de patente 1: JP 2006-314285 A da a conocer un portador de soporte para cultivos celulares que consiste en un compuesto de gel basado en compuestos de polivinilacetato moldeados.

Documento de patente 2: JP 2010-158180 A da a conocer un material de andamiaje de polímero sintético para cultivar células pluripotentes indiferenciadas.

Documento de patente 3: JP 2017-23008 A da a conocer un método para cultivar células madre usando incubadoras con superficies de copolímero de bloque de polirotaxano.

50 **Técnica anterior no de patente**

Documento 4: G. BAYRAMOGLU *ET AL*: MACROMOLECULAR RESEARCH, vol. 19, n.º 4, 1 de abril de 2011, páginas 385-395, describe células madre derivadas de la médula ósea en hidrogel elaborado con metacrilato de 2-hidroxietilo (pHEMA).

60 **Sumario de la invención**60 **Problemas que van a resolverse mediante la invención**

Sin embargo, el documento de patente 1 tiene el problema de que la resina del material de andamiaje se hincha en un medio debido a su alta hidrofiliia y, por tanto, se desprende. Además, existe el problema de que la fijación de células madre o células madre pluripotentes después de la siembra es tan baja que las células no proliferan lo suficiente. En el documento de patente 2, se usan 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, p-estirenosulfonato de sodio y N,N'-dimetilacrilamida, de modo que existe el problema de que la resina del material

de andamiaje se hincha en un medio debido a su alta hidrofilia, por lo que se desprende. El documento de patente 3 tiene el problema de que la resina del material de andamiaje se hincha en un medio debido a su alta hidrofilia y, por tanto, se desprende. Además, existe el problema de que el material de andamiaje es tan flexible que se promueve la diferenciación en cardiomiocitos.

5 Tal como se describió anteriormente, ha habido necesidades de un material de andamiaje para el cultivo de células madre que tenga hidrofilia y resistencia adecuadas, y un método de cultivo de células madre que use el mismo.

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un material de andamiaje para el cultivo de células madre que tenga hidrofilia y resistencia adecuadas, una alta fijación de las células madre después de la siembra y una proliferación celular altamente eficaz, y un método de cultivo de células madre que use el mismo.

Medios para resolver los problemas

15 La presente invención se refiere a un material de andamiaje para cultivar una célula madre tal como se define en la reivindicación 1 y a un método para cultivar una célula madre tal como se define en la reivindicación 7.

Efecto de la invención

20 Según la presente invención, se proporciona un material de andamiaje para el cultivo de células madre que tiene una hidrofilia y resistencia adecuadas y una alta fijación de las células madre después de la siembra, y un método de cultivo de células madre que usa el mismo.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La figura 1 es una vista que resume la relación de γ^P con γ^d de las principales resinas sintéticas.

[Fig. 2] La figura 2 es una vista parcialmente ampliada de la figura 1.

30 [Fig. 3] La figura 3 es una vista parcialmente ampliada de la figura 1.

[Fig. 4] La figura 4 es una vista que muestra los criterios de evaluación para la adherencia inicial 24 horas después de la siembra celular.

35 [Fig. 5] La figura 5 son micrografías de contraste de fases en los materiales de andamiaje para el cultivo de células madre según los ejemplos 24 horas después de la siembra celular.

[Fig. 6] La figura 6 son micrografías de contraste de fases en el material de andamiaje para el cultivo de células madre según los ejemplos comparativos 24 horas después de la siembra celular.

[Fig. 7] La figura 7 es una vista que muestra los criterios de evaluación para la proliferación celular 5 días después de la siembra celular.

45 [Fig. 8] La figura 8 muestra micrografías de contraste de fases en los materiales de andamiaje para el cultivo de células madre según los ejemplos 5 días después de la siembra celular.

[Fig. 9] La figura 9 muestra micrografías de contraste de fases en el material de andamiaje para el cultivo de células madre según los ejemplos comparativos 5 días después de la siembra celular.

Modos de realización de la invención

A continuación en el presente documento, se hace una descripción de la presente invención con referencia a realizaciones, pero la presente invención no se limita a las siguientes realizaciones.

55 En primer lugar, se hace una descripción de los términos usados en esta memoria descriptiva.

60 "Célula madre" se refiere a una célula que tiene potencia de autorrenovación y potencia de diferenciación. Entre las células madre, aquellas que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse de una célula a todas las células del endodermo, mesodermo y ectodermo se denominan "células madre pluripotentes".

Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre pluripotentes inducidas (a continuación en el presente documento denominadas "células iPS"), células madre embrionarias (a continuación en el presente documento denominadas "células ES"), células Muse (células multilíneas que soportan estrés y se diferencian), células cancerosas embrionarias, células germinales embrionarias y células mGS (células madre germinales multipotentes).

Entre las células madre, las que tienen capacidad de autorrenovarse, pertenecen a cualquiera de los tejidos ectodérmicos, endodérmicos, mesodérmicos y de la línea germinal, y exhiben una capacidad limitada para diferenciarse en los tipos de células constituyentes de un órgano al que pertenecen se denominan “células madre de tejido” y “células progenitoras de tejido”.

Los ejemplos de células madre de tejido y células progenitoras de tejido incluyen células madre neurales, células madre de cresta neural, células madre de retina, células madre de córnea, células madre epidérmicas de queratinocitos, células madre de melanocitos, células madre de glándula mamaria, células madre de hígado, células madre intestinales, células madre de las vías respiratorias, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimatosas, células madre cardíacas, células progenitoras endoteliales vasculares, pericitos vasculares, células madre del músculo esquelético, células madre adiposas, células progenitoras renales y células madre del esperma. Tales células madre pueden incluir, por ejemplo, células madre descritas en “Understanding It Better! Stem Cells and Regenerative Medicine (Motto Yoku Wakaru! Kansaibo to Saisei Iryo)” (Yodosha Co., Ltd., Kenji Osafune).

Material de andamiaje para el cultivo de células madre 1

Para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores han descubierto que los problemas anteriores pueden resolverse controlando la energía libre superficial de un material de andamiaje para el cultivo de células madre y, por tanto, han completado la presente invención. En otras palabras, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un material de andamiaje para cultivo de células madre en el que la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p de la energía libre superficial están dentro de un determinado intervalo.

Hay que tener en cuenta que la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p de la energía libre superficial en esta memoria descriptiva puede medirse usando la fórmula teórica de Kaelble-Uy.

En este caso, la fórmula teórica de Kaelble-Uy se basa en el supuesto de que la energía libre superficial total γ se compone de la suma de la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p , tal como se representa mediante la ecuación (1).

Ecuación 1

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (1)$$

Además, cuando la energía libre superficial de la superficie del líquido está representada por γ_l , la energía libre superficial del sólido está representada por γ_s , y el ángulo de contacto está representado por θ , se establece la siguiente ecuación (2).

Ecuación 2

$$\gamma_l (1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_l^p} \quad (2)$$

Por consiguiente, el uso de dos tipos de líquidos (agua pura y diyodometano en la presente invención) con componentes conocidas de γ_l , la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p de un material de andamiaje para el cultivo de células madre se determinan midiendo cada ángulo de contacto θ con respecto al material de andamiaje para el cultivo de células madre y resolviendo ecuaciones simultáneas para γ_s^d y γ_s^p .

El ángulo de contacto del agua pura puede obtenerse dejando caer 1 l de agua pura sobre el material de andamiaje y luego fotografiando la imagen de la gota después de 30 segundos usando un medidor de ángulo de contacto (fabricado por Kyowa Interface Science, Inc., DMO-701). Además, el ángulo de contacto del diyodometano puede obtenerse dejando caer 1 l de diyodometano sobre el material de andamiaje y luego fotografiando de manera similar la imagen de la gota después de 30 segundos.

El material de andamiaje para el cultivo de células madre contiene una resina sintética desde el punto de vista del ajuste adecuado de la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p de la energía libre superficial. Además, la resina sintética contiene al menos uno cualquiera de un esqueleto de polivinilacetato y un esqueleto de éster poli(met)acrílico desde el punto de vista de ajustar adecuadamente la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p de la energía libre superficial.

La figura 1 es una vista que resume la razón entre la componente dipolar γ^p y la componente de dispersión γ^d de

la energía libre superficial de las principales resinas sintéticas. Cada una de las figuras 2 y 3 son una vista parcialmente ampliada de la figura 1.

5 La componente de dispersión γ^d de la energía libre superficial del material de andamiaje para el cultivo de células madre de la presente invención es 28,0 o más y menos de 38,0. La componente de dispersión γ^d es más preferiblemente 32,8 o más y 36,0 o menos.

10 La componente dipolar γ^p de la energía libre superficial del material de andamiaje para el cultivo de células madre de la presente invención es 1,0 o más y menos de 10,0, preferiblemente 2,5 o más y 5,0 o menos.

La componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p pueden controlarse, por ejemplo, cambiando apropiadamente el esqueleto de la resina sintética que se describe a continuación.

15 Por ejemplo, la componente de dispersión γ^d puede aumentarse aumentando la cantidad de un grupo funcional no polar en el esqueleto de la resina sintética o introduciendo un grupo funcional que tiene una estructura cíclica, o puede disminuirse reduciendo la cantidad de un componente del grupo butilo en la resina sintética, o similar. La resina sintética contiene al menos uno cualquiera de un esqueleto de polivinilacetato y un esqueleto de éster poli(met)acrílico.

20 Por ejemplo, la componente dipolar γ^p puede aumentarse aumentando la cantidad de un grupo funcional polar en el esqueleto de la resina sintética o introduciendo un grupo funcional que tiene una estructura de éter, o puede disminuirse aumentando la cantidad de un grupo butilo que es un grupo funcional no polar.

25 Resina sintética

La resina sintética se refiere a una resina compuesta principalmente de un polímero (a continuación en el presente documento, también denominado simplemente "polímero") obtenido mediante polimerización (incluyendo policondensación) de un monómero polimerizable (a continuación en el presente documento, también denominado simplemente "monómero"). El polímero también incluye un copolímero de uno o dos o más monómeros polimerizables.

30 Los ejemplos del polímero incluyen un polímero que se compone de uno o más monómeros polimerizables tales como hidrocarburos (in)saturados, hidrocarburos aromáticos, ácidos grasos (in)saturados, ácidos carboxílicos aromáticos, cetonas (in)saturadas, cetonas aromáticas, alcoholes (in)saturados, alcoholes aromáticos, aminas (in)saturadas, aminas aromáticas, tioles (in)saturados, tioles aromáticos y compuestos organosilícicos.

35 Los ejemplos específicos del polímero incluyen poliolefina, poliéter, poli(alcohol vinílico), polivinilacetato, poliéster, éster poli(met)acrílico, resina epoxídica, poliamida, poliimida, poliuretano, policarbonato, celulosa y polipéptido. Entre ellos, desde el punto de vista de la fijación de células madre, son preferibles el éster poli(met)acrílico y el polivinilacetato, y es más preferible el polivinilacetato.

40 Estos polímeros pueden usarse solos o en combinación de dos o más. Cuando se combinan dos o más polímeros, pueden usarse como una mezcla o pueden usarse como un polímero en el que los esqueletos de los dos o más polímeros están unidos químicamente. Cuando se combinan dos o más polímeros como una resina sintética, es preferible combinar éster poli(met)acrílico y polivinilacetato.

45 En la presente memoria descriptiva, "(met)acrilato" se refiere a al menos uno seleccionado del grupo que consiste en éster (met)acrílico y ácido (met)acrílico. Además, el poli(met)acrilato no son sólo polímeros obtenidos polimerizando un monómero, éster (met)acrílico o ácido (met)acrílico, sino que también incluye los obtenidos copolimerizando un monómero además de éster (met)acrílico o ácido (met)acrilato.

50 El éster (met)acrílico no está particularmente limitado, pero incluye ésteres alquil (met)acrílicos, ésteres alquil (met)acrílicos cíclicos, ésteres aril (met)acrílicos, (met)acrilamidas, (met)acrilatos de polietilenglicol y (met)acrilatos de fosforilcolina.

55 Los ejemplos de éster (met)acrílico de alquilo incluyen (met)acrilato de metilo, (met)acrilato de etilo, (met)acrilato de n-propilo, (met)acrilato de isopropilo, (met)acrilato de n-butilo, (met)acrilato de isobutilo, (met)acrilato de t-butilo, (met)acrilato de n-octilo, (met)acrilato de isooctilo, (met)acrilato de 2-etilhexilo, (met)acrilato de nonilo, (met)acrilato de isononilo, (met)acrilato de decilo, (met)acrilato de isodecilo, (met)acrilato de laurilo, (met)acrilato de estearilo y (met)acrilato de isotetradecilo.

60 Estos ésteres alquil(met)acrílicos no están particularmente limitados, pero pueden estar sustituidos con diversos sustituyentes que incluyen un grupo alcoxilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono y un grupo tetrahydrofurfurilo. Los ejemplos incluyen acrilato de metoxietilo y acrilato de tetrahydrofurfurilo.

65

Los ejemplos de éster (met)acrílico de alquilo cíclico incluyen (met)acrilato de ciclohexilo y (met)acrilato de isobornilo.

Los ejemplos de éster aril(met)acrílico incluyen (met)acrilato de fenilo y (met)acrilato de bencilo.

Los ejemplos de acrilamida incluyen (met)acrilamida, N-isopropil(met)acrilamida, N-terc-butil(met)acrilamida, N,N'-dimetil(met)acrilamida, cloruro de (3-(met)acrilamidopropil)trimetilamonio, 4-(met)acriloilmorfolina, 3-(met)acriloil-2-oxazolidinona, N-[3-(dimetilamino)propil](met)acrilamida, N-(2-hidroxiethyl)(met)acrilamida, N-metilol(met)acrilamida)acrilamida y ácido 6-(met)acrilamidohexanoico.

Los ejemplos de (met)acrilato de polietilenglicol incluyen (met)acrilato de metoxi-polietilenglicol, (met)acrilato de etoxi-polietilenglicol, (met)acrilato de hidroxipolietilenglicol, (met)acrilato de metoxi-dietilenglicol, etoxi-dietilenglicol (met)acrilato, (met)acrilato de hidroxidietilenglicol, (met)acrilato de metoxitrietilenglicol, (met)acrilato de etoxitrietilenglicol y (met)acrilato de hidroxitrietilenglicol.

Los ejemplos de (met)acrilato de fosforilcolina incluyen 2-(met)acriloiloxietilfosforilcolina.

Los monómeros distintos de los ésteres (met)acrílicos no están particularmente limitados, pero incluyen ácidos (met)acrílicos, ésteres de etileno y vinilo.

Los ésteres (met)acrílicos pueden usarse solos o en combinación de dos o más. En esta memoria descriptiva, ácido (met)acrílico es un término genérico para ácido acrílico y ácido metacrílico, y (met)acrilato es un término genérico para acrilato y metacrilato.

La presente invención es preferiblemente una combinación con el aspecto descrito a continuación desde el punto de vista de mejorar la fijación de células madre.

Material de andamiaje para el cultivo de células madre 2

Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores han descubierto que los problemas anteriores pueden resolverse usando una resina sintética que contiene una resina de polivinilacetato y, por tanto, han completado la presente invención.

Un aspecto que no se reivindica se refiere a un material de andamiaje para cultivo de células madre que contiene una resina sintética, en el que la resina sintética contiene una resina de polivinilacetato y el grado de acetalización de la resina de polivinilacetato es superior al 60 % en mol. El material de andamiaje para el cultivo de células madre de la presente invención incluye un aspecto en el que el material se compone únicamente de una resina sintética.

El material de andamiaje para el cultivo de células madre tiene una hidrofilia y resistencia tan adecuadas que mejora la fijación de las células madre después de la siembra. En particular, en un medio de cultivo sin suero que no contiene células alimentadoras ni proteínas adhesivas, se mejora la tasa de fijación inicial de las células madre después de la siembra.

Convencionalmente, no se ha informado que se establezca el grado de acetalización de una resina sintética en más del 60 % en mol cuando la resina sintética se usa como material de andamiaje para el cultivo de células madre. Esto se debe a que ha habido preocupación por una disminución en la proporción de grupos hidroxilo con un aumento en el grado de acetalización, cuya disminución reduce la hidrofilia de una resina, lo que lleva a una menor fijación de las células madre después de sembrarlas en un material de andamiaje para cultivo de células madre, o una disminución de la permeabilidad de los polisacáridos necesarios para el cultivo celular y similares. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que la resistencia es más importante que la hidrofilia, y mejorar la resistencia de un material de andamiaje para el cultivo de células madre estableciendo el grado de acetalización en más del 60 % en mol permite que la fijación de las células madre después de la siembra se mejora, y así haber completado la presente invención. A continuación en el presente documento, se realiza una descripción detallada de la resina de polivinilacetato.

Resina de polivinilacetato

La resina de polivinilacetato es una resina sintetizada acetalizando poli(alcohol vinílico) con un aldehído, resina que tiene un grupo acetilo, un grupo hidroxilo y un grupo acetal en la cadena lateral.

El límite inferior del grado de acetalización de la resina de polivinilacetato es preferiblemente del 60 % en mol, y el límite superior del mismo es preferiblemente del 90 % en mol. Cuando el grado de acetalización es del 60 % en mol o más, la fijación de las células madre es excelente y, por tanto, la proliferación celular puede realizarse con alta eficacia. Cuando el grado de acetalización es del 90 % en mol o menos, la solubilidad en el disolvente puede ser mejor. El límite inferior es más preferiblemente el 65 % en mol, y el límite superior es más preferiblemente el

85 % en mol.

El grado de acetal de la resina de polivinilacetato puede medirse mediante medición de $^1\text{H-RMN}$.

- 5 Los aldehídos para uso en acetilación incluyen aldehídos que tienen un grupo alifático de cadena, un grupo alifático cíclico o un grupo aromático que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Como aldehídos pueden usarse aldehídos conocidos habitualmente por el público.

- 10 El tipo de aldehído no está particularmente limitado, pero incluye formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, acroleína, benzaldehído, cinamaldehído, perilaldehído, formilpiridina, formilimidazol, formilpirrol, formilpiperidina, formilpiperidina, formiltriazol, formiltetrazol, formilindol, formilisoindol, formilpurina, formilpurina, formilbencimidazol, formilbenzotriazol, formilquinolina, formilisoquinolina, formilquinoxalina, formilcinnolina, formilpteridina, formilfurano, formiloxolano, formiloxano, formiltiofeno, formiltiolano, formiltiano, formiladenina, formilguanina, formilcitosina, formiltimina y formiluracilo. El aldehído puede ser de cadena o cíclico.

15 El aldehído es preferiblemente formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído o pentanal, más preferiblemente butiraldehído.

- 20 El límite inferior del grado de polimerización de la resina de polivinilacetato es preferiblemente 100, más preferiblemente 200, todavía más preferiblemente 500, incluso más preferiblemente 1500. Cuando el grado de polimerización está en el intervalo anterior, la resistencia del material de andamiaje puede ser se mantiene adecuadamente incluso cuando se hincha en un medio que va a usarse para cultivo celular, de modo que se mejora la proliferación celular. El límite superior del grado de polimerización es preferiblemente 6000, más
25 preferiblemente 3000, todavía más preferiblemente 2500. Cuando el grado de polimerización está en el intervalo anterior, la manejabilidad es buena y el material de andamiaje puede moldearse adecuadamente.

- 30 El poli(alcohol vinílico) puede ser un copolímero con un compuesto de vinilo. El compuesto de vinilo incluye etileno, alilamina, vinilpirrolidona, anhídrido maleico, maleimida, ácido itacónico, ácido (met)acrílico, vinilamina y éster (met)acrílico. Como éster (met)acrílico pueden usarse, por ejemplo, los ésteres (met)acrílicos mencionados anteriormente.

- 35 La resina de polivinilacetato puede ser un copolímero de injerto con un compuesto de vinilo. El compuesto de vinilo incluye los compuestos mencionados anteriormente.

- 40 El copolímero de injerto contiene un copolímero de injerto que tiene una "unidad que se compone de polivinilacetato" y una "unidad que se compone de un compuesto de vinilo" (a continuación en el presente documento, también denominado simplemente "copolímero de injerto"). El compuesto de vinilo se refiere a un compuesto que tiene una unidad estructural que tiene un grupo etenilo ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-$).

- 45 En la presente invención, la "unidad que se compone de polivinilacetato" y la "unidad que se compone de un compuesto de vinilo" se refieren a "polivinilacetato" y una "unidad que se compone de un compuesto de vinilo" presente en el copolímero de injerto. Además, un copolímero de injerto que tiene una unidad que se compone de una unidad que se compone de polivinilacetato y una unidad que se compone de un compuesto de vinilo se refiere a un copolímero ramificado en el que, a una "unidad que se compone de polivinilacetato" o una "unidad que se compone de un compuesto de vinilo" que compone la cadena principal, se une una "unidad que se compone de polivinilacetato" o una "unidad que se compone de un compuesto de vinilo" que compone una cadena lateral diferente de la cadena principal.

- 50 El peso molecular del copolímero de injerto no está particularmente limitado, pero es preferible que el peso molecular promedio en número (M_n) sea de 10.000 a 600.000, el peso molecular promedio en peso (M_w) sea de 20.000 a 1.200.000 y la razón (M_w/M_n) sea de 2,0 a 40. Cuando M_n , M_w y M_w/M_n están en tales intervalos, la resistencia del material de andamiaje para células madre se mantiene adecuadamente.

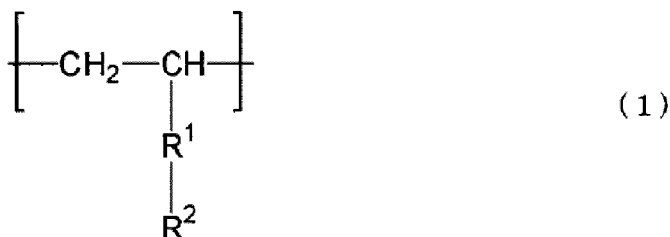
- 55 Los ejemplos del método para medir el grado de acetilación en el copolímero de injerto incluyen un método para medir el grado de acetilación mediante medición de $^1\text{H-RMN}$ en la que un componente soluble del copolímero de injerto en xileno se disuelve en dimetilsulfóxido deuterado.

- 60 La resina de polivinilacetato presenta preferiblemente por su parte un grupo básico de Bronsted o un grupo ácido de Bronsted. En otras palabras, una parte de la resina de polivinilacetato se modifica preferiblemente con un grupo básico de Bronsted o un grupo ácido de Bronsted, más preferiblemente se modifica con un grupo básico de Bronsted. Cuando una parte de la resina de polivinilacetato se modifica con un grupo básico de Bronsted o un grupo ácido de Bronsted, en un medio de cultivo sin suero que no contiene células alimentadoras ni proteínas adhesivas, se mejora la tasa de fijación inicial después de la siembra de células madre y el cultivo de células
65 madre se vuelve más fácil.

En la presente memoria descriptiva, una resina de polivinilacetal que tiene un grupo básico de Bronsted o un grupo ácido de Bronsted en una parte de la resina de polivinilacetal se denomina resina de polivinilacetal modificada.

- 5 El grupo básico de Bronsted es un término genérico para un grupo funcional que puede recibir un ion hidrógeno H^+ de otra sustancia. Los ejemplos del grupo básico de Bronsted incluyen grupos básicos basados en amina tales como un sustituyente que tiene una estructura de amina, un sustituyente que tiene una estructura de imina, un sustituyente que tiene una estructura de amida y un sustituyente que tiene una estructura de imida.
- 10 Por consiguiente, como una resina de polivinilacetal de este tipo, son preferibles las resinas de polivinilacetal que contienen como unidad estructural al menos una seleccionada del grupo que consiste en una unidad estructural que tiene una estructura de amina, una unidad estructural que tiene una estructura de imina, una unidad estructural que tiene una estructura de amida estructura y una unidad estructural que tiene una estructura imida. El contenido total de la unidad estructural que tiene una estructura de amina, la unidad estructural que tiene una estructura de imina, la unidad estructural que tiene una estructura de amida y la unidad estructural que tiene una estructura de imida es preferiblemente del 0,1 % en mol al 30 % en mol en la resina de polivinilacetal, y más preferiblemente del 1 % en mol al 10 % en mol desde el punto de vista de la adherencia celular inmediatamente después de la siembra.
- 20 En la presente invención, la estructura de imina se refiere a una estructura que tiene un enlace $C=N$. La resina de polivinilacetal tiene preferiblemente una estructura de imina en la cadena lateral. Además, la estructura de imina puede estar unida directamente a un carbono que constituye la cadena principal de la resina de polivinilacetal, o puede estar unida mediante un grupo de unión tal como un grupo alquileo. Obsérvese que tener la estructura de imina en la cadena lateral incluye tener la estructura de imina en la cadena de injerto de la resina de polivinilacetal. Los ejemplos de unidad estructural que tiene una estructura de imina incluyen una
- 25 unidad estructural representada por la siguiente fórmula (1).

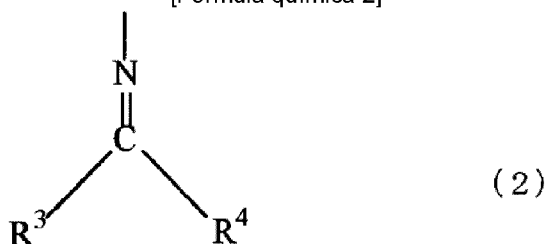
[Fórmula química 1]



- 30 En la fórmula (1), R^1 representa un enlace sencillo o un grupo alquileo, y R^2 representa un grupo que tiene una estructura de imina.
- 35 En la fórmula (1), cuando R^1 es un grupo alquileo, el límite inferior preferido del número de átomos de carbono en el grupo alquileo es 1 y el límite superior preferido es 12. Cuando el número de átomos de carbono en el grupo alquileo excede 12, es posible que no se obtenga una resistencia óptima. Cuando R^1 es un grupo alquileo, el límite superior más preferido del número de átomos de carbono en el grupo alquileo es 5.
- 40 En la fórmula (1), cuando R^1 es un grupo alquileo, los ejemplos del grupo alquileo incluyen grupos alquileo lineales tales como un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo trimetileno, un grupo tetrametileno, un grupo pentametileno, un grupo hexametileno, un grupo octametileno y un grupo decametileno, grupos alquileo ramificados tales como un grupo metilmetileno, grupo metiletileno, grupo 1-metilpentileno y grupo 1,4-dimetilbutileno, y grupos alquileo cíclicos tales como un grupo ciclopropileno, un grupo ciclobutileno y un grupo ciclohexileno. Entre ellos, es preferible un grupo alquileo lineal tal como un grupo metileno, un grupo etileno, un
- 45 grupo trimetileno y un grupo tetrametileno, y son más preferibles un grupo metileno y un grupo etileno.

El R^2 incluye un grupo funcional representado por la siguiente fórmula (2).

[Fórmula química 2]



5 En la fórmula (2), R³ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono, y R⁴ representa un grupo hidrocarburo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono.

10 El grupo hidrocarburo incluye un grupo hidrocarburo saturado, un grupo hidrocarburo insaturado y un grupo hidrocarburo aromático. El grupo hidrocarburo puede ser uno que se compone sólo de uno cualquiera de un grupo hidrocarburo saturado, un grupo hidrocarburo insaturado y un grupo hidrocarburo aromático, o uno en el que se usan dos o más de ellos.

15 Los ejemplos del grupo hidrocarburo saturado incluyen grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, 2-etilhexilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo y octadecilo. Entre ellos, son preferibles un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo y un grupo n-butilo.

Los ejemplos del grupo hidrocarburo aromático incluyen un grupo fenilo, un grupo toluilo, un grupo xililo, un grupo t-butilfenilo y un grupo bencilo.

20 En la resina de polivinilacetil modificada, es preferible que en la unidad estructural que tiene una estructura de imina, R¹ sea un enlace simple, R³ sea un átomo de hidrógeno, un grupo metilo o un grupo etilo, y R⁴ sea un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo.

25 En la resina de polivinilacetil, el límite inferior preferido del contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina es del 0,1 % en mol, y el límite superior preferido es del 20,0 % en mol. Cuando el contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina es del 0,1 % en mol o más, la estabilidad de la viscosidad con el tiempo mejora. Cuando el contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina es del 20,0 % en mol o menos, la acetalización puede avanzar suficientemente. El límite inferior más preferido del contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina es del 1,0 % en mol, y el límite superior más preferido es del 15,0 % en mol.

El contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina puede medirse mediante medición de ¹H-RMN.

35 En la resina de polivinilacetil, la razón entre el contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina y el grado de acetalización descrito a continuación (el contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina/grado de acetalización) es preferiblemente de 0,001 a 0,5. Dentro del intervalo anterior, puede lograrse una alta resistencia y una excelente adhesividad al mismo tiempo, y puede mejorarse la durabilidad después de la adherencia.

40 La resina de polivinilacetil tiene preferiblemente una unidad estructural que tiene una estructura de grupo imino (=NH).

45 La resina de polivinilacetil tiene preferiblemente el grupo imino en la cadena lateral. Además, el grupo imino puede estar unido directamente a un carbono que constituye la cadena principal de la resina de polivinilacetil, o puede estar unido mediante un grupo de unión tal como un grupo alquileo.

La resina de polivinilacetil modificada tiene preferiblemente una unidad estructural que tiene una estructura de amina o una unidad estructural que tiene una estructura de amida.

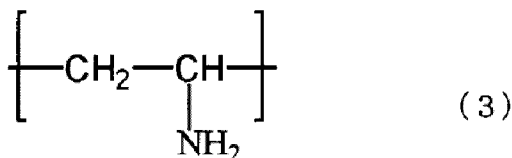
50 La resina de polivinilacetil modificada tiene preferiblemente la estructura de amina o la estructura de amida en la cadena lateral. Además, la estructura de amina o la estructura de amida pueden estar unidas directamente a un carbono que constituye la cadena principal de la resina de polivinilacetil modificada, o pueden estar unidas a través de un grupo de unión tal como un grupo alquileo. Además, la estructura de amina puede ser una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria o una amina cuaternaria. Entre ellos, es preferible una amina primaria desde el punto de vista de mejorar la fijación de las células madre.

Obsérvese que tener la estructura de amina o la estructura de amida en la cadena lateral significa tener la

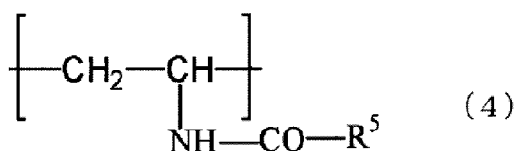
estructura de amina o la estructura de amida en la cadena de injerto de la resina de polivinilacetal modificada.

En particular, la estructura de amina es preferiblemente -NH₂. En la presente invención, la estructura de amida se refiere a una estructura que tiene -C(=O)-NH-. En particular, la unidad estructural que tiene la estructura de amina es preferiblemente una estructura representada por la siguiente fórmula (3). Además, la unidad estructural que tiene la estructura de amida tiene preferiblemente una estructura representada por la siguiente fórmula (4).

[Fórmula química 3]



[Fórmula química 4]



En la fórmula (4), R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. El grupo hidrocarburo incluye un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo cicloalquilo y un grupo cicloalquenilo.

El límite inferior preferido del contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de amina o una estructura de amida es del 0,1 % en mol, y el límite superior preferido es del 20 % en mol. Cuando el contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de amina o una estructura de amida es del 0,1 % en mol o más, pueden hacerse suficientes propiedades adicionales. Cuando el contenido es del 20 % en mol o menos, la solubilidad no aumenta tan excesivamente como para que el polvo de resina de polivinilacetal modificada pueda extraerse fácilmente mediante el método de precipitación. El límite inferior más preferido del contenido es del 0,5 % en mol y el límite superior más preferido es del 10 % en mol. El contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de amina o una estructura de amida puede medirse mediante medición de ¹H-RMN. Además, el límite inferior preferido del contenido total de la unidad estructural que tiene una estructura de amina o una estructura de amida y la unidad estructural que tiene una estructura de imina es del 0,1 % en mol, y el límite superior preferible es del 20 % en mol. El límite inferior más preferido del contenido es del 0,5 % en mol y el límite superior más preferido es del 10 % en mol.

En la resina de polivinilacetal, la razón entre el contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina y el de la unidad estructural que tiene una estructura de amina o una estructura de amida (la unidad estructural que tiene una estructura de imina/la unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida) es preferiblemente de 0,5/99,5 a 99,5/0,5. Cuando la razón es 0,5/99,5 o más, la estabilidad de la viscosidad a lo largo del tiempo puede ser suficiente, mientras que cuando la razón anterior es 99,5/0,5 o menos, el rendimiento de reticulación puede exhibirse suficientemente desde el punto de vista de mejorar la fijación de las células madre. El límite inferior más preferido de la razón es 5/95 y el límite superior más preferido es 90/10.

El grupo ácido de Bronsted es un término genérico para un grupo funcional que puede liberar un ion hidrógeno H⁺ a otra sustancia.

El grupo ácido de Bronsted incluye un grupo carboxilo, un grupo de ácido sulfónico, un grupo de ácido maleico, un grupo de ácido sulfínico, un grupo de ácido sulfénico, un grupo de ácido fosfórico, un grupo de ácido fosfónico y sus sales. Entre ellos, es preferible un grupo carboxilo como grupo ácido de Bronsted.

El método para modificar la resina de polivinilacetal con el grupo ácido de Bronsted no está particularmente limitado, pero incluye un método para copolimerizar el poli(alcohol vinílico) con el ácido itacónico o ácido (met)acrílico y un método para introducir un grupo ácido de Bronsted en la cadena lateral del poli(alcohol vinílico).

El grado de acetalización de la resina de polivinilacetal no está particularmente limitado, pero el límite inferior es preferiblemente del 60 % en mol y el límite superior es preferiblemente del 90 % en mol. Cuando el grado de acetalización es del 60 % en mol o más, la fijación de las células madre es excelente y, por tanto, la proliferación celular puede realizarse con alta eficacia. Cuando el grado de acetalización es del 90 % en mol o menos, la

solubilidad en el disolvente puede ser mejor. El límite inferior es más preferiblemente del 65 % en mol, y el límite superior es más preferiblemente del 85 % en mol. El grado de acetal de la resina de polivinilacetal puede medirse mediante medición de $^1\text{H-RMN}$.

- 5 La cantidad del grupo acetilo en la resina de polivinilacetal no está particularmente limitada, pero el límite inferior es preferiblemente del 0,0001 % en mol y el límite superior es preferiblemente del 5 % en mol.

Los ejemplos del método para producir la resina de polivinilacetal incluyen un método para acetalizar usando un método convencionalmente conocido un poli(alcohol vinílico) obtenido saponificando acetato de polivinilo obtenido copolimerizando el monómero que tiene una estructura de imina con acetato de vinilo. Además, también puede usarse un método para introducir una estructura de imina acetalizando usando un método convencionalmente conocido un poli(alcohol vinílico) que tiene una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida. También puede usarse un método para acetalizar usando un método convencionalmente conocido un poli(alcohol vinílico) modificado que tiene una estructura de imina obtenido modificando posteriormente un poli(alcohol vinílico) que tiene una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida. Además, puede introducirse una estructura de imina modificando posteriormente una resina de polivinilacetal no modificada. En otras palabras, la resina de polivinilacetal modificada puede ser un producto acetalizado de un poli(alcohol vinílico) que tiene una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida. Entre ellos, es preferible un método para producir una resina de polivinilacetal modificada que tiene una estructura de imina acetalizando un poli(alcohol vinílico) que tiene una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida. En particular, cuando se usa un método de este tipo, puede obtenerse una estructura de imina añadiendo cantidades excesivas de aldehído y catalizador ácido para su uso en la acetalización.

- 25 En el método para añadir excesivamente aldehído, es preferible añadir de 70 a 150 partes en peso de aldehído a 100 partes en peso de un poli(alcohol vinílico) que tiene una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida. En particular, como aldehído, son preferibles acetaldehído, propionaldehído, n-butiraldehído, isobutiraldehído, n-valeraldehído y fenilaldehído.

- 30 En el método para añadir excesivamente un catalizador ácido, es preferible añadir el catalizador ácido en una cantidad del 0,5 % en peso o más con respecto al peso total. Además, es preferible añadir de 5,0 a 70,0 partes en peso de catalizador ácido a 100 partes en peso de un poli(alcohol vinílico) que tiene una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida. En particular, como catalizador ácido, son preferibles el ácido clorhídrico, el ácido nítrico, el ácido sulfúrico y el ácido para-toluenosulfónico. En el caso en que se use tal método, los ejemplos del método para confirmar una unidad estructural que tiene un grupo amino o una estructura de amida, o una unidad estructural que tiene una estructura de imina incluyen un método de confirmación mediante $^1\text{H-RMN}$.

- 40 La acetalización puede realizarse usando un método conocido y se realiza preferiblemente en un disolvente acuoso, un disolvente mixto de agua y un disolvente orgánico que tenga compatibilidad con agua, o un disolvente orgánico. Como disolvente orgánico compatible con agua, puede usarse, por ejemplo, un disolvente orgánico a base de alcohol. Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen disolventes orgánicos a base de alcohol, disolventes orgánicos aromáticos, disolventes a base de ésteres alifáticos, disolventes a base de cetonas, disolventes a base de parafina inferior, disolventes a base de éter y disolventes a base de aminas. Los ejemplos de disolvente orgánico a base de alcohol incluyen metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol y terc-butanol. Los ejemplos de disolvente orgánico aromático incluyen xileno, tolueno, etilbenceno y benzoato de metilo.

- 50 Los ejemplos del disolvente basado en éster alifático incluyen acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de butilo, propionato de metilo, propionato de etilo, butirato de metilo, butirato de etilo, acetoacetato de metilo y acetoacetato de etilo.

- Los ejemplos del disolvente a base de cetona incluyen acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, ciclohexanona, metilciclohexanona, benzofenona y acetofenona. Los disolventes inferiores a base de parafina incluyen hexano, pentano, octano, ciclohexano y decano. Los disolventes a base de éter incluyen dietil éter, tetrahidrofurano, dimetil éter de etilenglicol, dietil éter de etilenglicol y dietil éter de propilenglicol. Los disolventes a base de amida incluyen N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona y acetanilida.

- 60 Los disolventes a base de amina incluyen amoníaco, trimetilamina, trietilamina, n-butilamina, di-n-butilamina, tri-n-butilamina, anilina, N-metil-anilina, N,N-dimetil-anilina y piridina.

- Estos pueden usarse solos o como una mezcla de dos o más disolventes. Entre ellos, son particularmente preferibles etanol, n-propanol, isopropanol y tetrahidrofurano desde el punto de vista de la solubilidad en una resina y la simplicidad durante la purificación.

- 65 La acetalización se realiza preferiblemente en presencia de un catalizador ácido. El catalizador ácido no está

particularmente limitado, pero incluye ácidos minerales tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido fosfórico, ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico, ácido acético y ácido propiónico, y ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido para-toluenosulfónico. Estos catalizadores ácidos pueden usarse solos o en combinación de dos o más compuestos. Entre ellos, son preferibles el ácido clorhídrico, el ácido nítrico y el ácido sulfúrico, y es particularmente preferible el ácido clorhídrico.

El material de andamiaje para células madre de la presente invención permite su uso como materiales de andamiaje para células madre cuyo tipo no está particularmente limitado. Especialmente, el material se usa preferiblemente para cultivar células madre pluripotentes, particularmente células iPS. En un medio de cultivo sin suero que no contiene células alimentadoras ni proteínas adhesivas, se mejora la tasa de fijación inicial de las células madre después de la siembra y puede realizarse adecuadamente el cultivo de células madre.

Método de cultivo de células madre

Según el material de andamiaje para el cultivo de células madre, aunque pueden cultivarse diversas células madre, en consideración de las propiedades, el material de andamiaje se usa preferiblemente para cultivar células madre pluripotentes entre células madre. Esto se debe a que, aunque se dice que las células madre pluripotentes tienen una tasa de fijación baja durante el cultivo después de la siembra en general, el material de andamiaje para el cultivo de células madre apenas se hincha con la humedad en un medio de cultivo y, por tanto, puede mantener una hidrofilia y resistencia tan adecuadas que mejora la tasa de fijación de células madre pluripotentes después de la siembra.

En el cultivo de células madre, el material de andamiaje para el cultivo de células madre puede usarse no sólo para el cultivo plano (método de cultivo bidimensional) sino también para cultivar células madre sobre un material base en un estado más cercano a un estado *in vivo*, tal como una membrana porosa o un hidrogel (método de cultivo tridimensional). Esto se debe a que las células madre pueden proliferar eficientemente usando el material de andamiaje para el cultivo celular en un biorreactor o similar.

El material de andamiaje para el cultivo celular se usa preferiblemente en un método de cultivo bidimensional porque tiene una hidrofilia y resistencia adecuadas.

El recipiente para cultivo planar (método de cultivo bidimensional) no está particularmente limitado en cuanto a forma y tamaño, pero incluye una placa de prueba para cultivo celular que tiene uno o más pocillos (agujeros) y un matraz para cultivo celular. El número de pocillos en la microplaca no está limitado, pero incluye, por ejemplo, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 96 y 384. La forma del pocillo no está particularmente limitada, pero incluye, por ejemplo, un círculo perfecto, elipse, triángulo, cuadrado, rectángulo y pentágono. La forma de la superficie del fondo del pocillo no está particularmente limitada, sino que incluye un fondo plano, un fondo redondo e irregularidades.

El material de la placa de prueba para cultivo celular que tiene uno o más pocillos (agujeros) o el material del matraz para cultivo celular no están particularmente limitados, pero incluyen una resina polimérica, metal y material inorgánico. La resina polimérica incluye poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato, poliéster, poliisopreno, polímero de cicloolefina, poliimida, poliamida, poliamidaimida, resina (met)acrílica, resina epoxídica y sílica. El metal incluye acero inoxidable, cobre, hierro, níquel, aluminio, titanio, oro, plata y platino. El material inorgánico incluye óxido de silicio (vidrio), óxido de aluminio, óxido de titanio, óxido de circonio, óxido de hierro y nitruro de silicio.

Además de lo anterior, el material de andamiaje para cultivo celular puede usarse en un método de cultivo en suspensión en el que las células madre se suspenden libremente y se cultivan en un medio.

Método de cultivo de células madre pluripotentes

En el método de cultivo de células madre pluripotentes, es preferible sembrar una masa celular en un material de andamiaje para el cultivo de células madre que contenga una resina sintética.

La masa celular puede obtenerse añadiendo un agente desprendible de células a un recipiente de cultivo confluyente y realizando uniformemente la trituración mediante pipeteo. El agente de separación de células no está particularmente limitado, pero es preferiblemente una disolución tampón de etilendiamina/fosfato. El tamaño de la masa celular es preferiblemente de 50 a 200 μm .

Otras realizaciones

Además del material de andamiaje para el cultivo de células madre, la presente invención proporciona una invención que usa el material de andamiaje para el cultivo de células madre como otra realización.

Por ejemplo, se proporciona un portador (medio) para el cultivo de células madre que contiene el material de

andamiaje para el cultivo de células madre y un polisacárido. Pueden usarse diversos polisacáridos como polisacárido sin ninguna limitación particular. Entre ellos, son preferibles los polisacáridos solubles en agua.

5 Se proporciona un recipiente para el cultivo de células madre provisto de una película de resina en al menos una parte de una región de cultivo celular, en el que el material de andamiaje para el cultivo de células madre se usa como película de resina. El recipiente no está particularmente limitado siempre que tenga una película de resina en al menos una parte de la región de cultivo celular, pero pueden usarse diversos recipientes. Como recipiente puede usarse un recipiente para cultivo plano, un biorreactor o similar.

10 Además de lo anterior, se proporciona una fibra para el cultivo de células madre que incluye el material de andamiaje para el cultivo de células madre. En este caso, es preferible que el material de andamiaje para el cultivo de células madre se aplique sobre la fibra. Además, el material de andamiaje para el cultivo de células madre puede estar en una forma impregnada o amasada en la fibra. La fibra para cultivo de células madre es adecuada para un método de cultivo tridimensional para células madre que son difíciles de adherir a una estructura plana tal como un matraz, pero que se adhieren fácilmente a una estructura tridimensional tal como una estructura similar a fibrillas. La fibra es particularmente adecuada para cultivar células madre adiposas entre células madre.

20 El material de andamiaje para el cultivo de células madre puede estar reticulado. Esto se debe a que la reticulación puede suprimir el hinchamiento del agua y aumentar adecuadamente la resistencia. Puede añadirse además un agente de reticulación al material de andamiaje para el cultivo de células madre para efectuar la reticulación.

25 El agente reticulante no está particularmente limitado, pero incluye polialcohol, poli(ácido carboxílico), ácido hidroxicarboxílico, jabón metálico y polisacáridos.

30 El polialcohol no está particularmente limitado, pero incluye etilenglicol, propilenglicol, butanodiol, pentanodiol, hexanodiol, heptanodiol, octanodiol, nonanodiol, decanodiol, dodecanodiol, undecanodiol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol, polietilenglicol, catecol, pirogalol, ácido diborónico, ácido metilendiborónico, ácido etilendiborónico, ácido propilendiborónico, ácido fenilendiborónico, ácido bifenildiborónico y derivados de bisfenol.

35 El poli(ácido carboxílico) no está particularmente limitado, pero incluye ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido sebáico, ácido ftálico y ácido poli(met)acrílico.

40 El ácido hidroxicarboxílico no está particularmente limitado, pero incluye ácido glicólico, ácido láctico, ácido tartrónico, ácido glicérico, ácido hidroxibutírico, ácido málico, ácido tartárico, ácido citomárico, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido leucico, ácido mevalónico, ácido pantoico, ácido ricinoleico, ácido, ácido ricineraídico, ácido cerebronico, ácido quínico, ácido shikímico, ácido hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido creosoteico, ácido vainílico, ácido siríngico, ácido pirocatequico, ácido resorcílico, ácido protocatequico, ácido gentísico, ácido orselínico, ácido gálico, ácido mandélico, ácido bencílico, ácido atroláctico, ácido melilótico, ácido florético, ácido cumárico, ácido umbélico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinapínico y ácido hidroxiesteárico.

45 El jabón metálico no está particularmente limitado, pero incluye sales de ácidos grasos tales como ácido esteárico, ácido láurico, ácido ricinoleico y ácido octílico con metales tales como litio, sodio, magnesio, calcio, bario, zinc y aluminio.

50 Los polisacáridos no están particularmente limitados, pero incluyen pectina, goma guar, goma xantana, goma de tamarindo, carragenano, propilenglicol, carboximetilcelulosa, amilosa, amilopectina, glucógeno, celulosa, quitina, agarosa, carragenano, heparina, ácido hialurónico, xiloglucano y ácido glucomanánico.

Ejemplos

55 A continuación en el presente documento, se hace una descripción de la presente invención con referencia a los ejemplos y los ejemplos comparativos, pero la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos. El contenido de la unidad estructural, por ejemplo, unidad estructural que tiene una estructura de amina (% en mol), contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de imina (% en mol), contenido de la unidad estructural que tiene una estructura de amida (% en mol), grado de acetalización (% en mol), cantidad de grupo acetilo (% en mol), cantidad de grupo hidroxilo (% en mol) y cantidad de éster (met)acrílico (% en mol) en una resina sintética obtenida, la resina de polivinilacetato modificada se midió disolviendo la resina sintética en DMSO-d6 (dimetilsulfóxido) y usando ¹H-RMN (espectro de resonancia magnética nuclear).

Ejemplo 1

65 Preparación de polivinilbutiral

Se cargó un reactor equipado con un agitador con 2700 ml de agua de intercambio iónico, 300 g de poli(alcohol vinílico) que tenía un grado medio de polimerización de 250 y un grado de saponificación del 99 % en mol, seguido de disolución calentando con agitación para preparar una disolución. A continuación, a la disolución, se añadió ácido clorhídrico al 35 % en peso como catalizador de modo que la concentración de ácido clorhídrico llegó a ser del 0,2 % en peso, y después de ajustar la temperatura a 15 °C, se añadieron 22 g de n-butiraldehído (n-BA) mientras se agitaba. Después de eso, cuando se añadieron 148 g de n-butiraldehído (n-BA), precipitó polivinilbutiral en forma de partículas blancas. Quince minutos después de la precipitación, se añadió ácido clorhídrico al 35 % en peso de modo que la concentración de ácido clorhídrico llegó a ser del 1,8 % en peso, seguido de calentamiento hasta 50 °C para envejecimiento a 50 °C durante 2 horas. A continuación, se enfrió y neutralizó la disolución y después se lavó el polivinilbutiral con agua y se secó.

El polivinilbutiral obtenido tenía un grado medio de polimerización de 250, una cantidad de grupo hidroxilo del 28 % en mol, una cantidad de grupo acetilo del 1 % en mol y un grado de acetalización del 71 % en mol.

Preparación de recipiente para cultivo celular

Disolviendo 1 g del polivinilbutiral obtenido en 19 g de butanol, se obtuvo una disolución de polivinilbutiral. Descargando 150 µl de la disolución obtenida de polivinilbutiral sobre un cubreobjetos de φ22 mm (fabricado por Matsunami Glass Ind., Ltd., se usaron 22 rondas n.º 1 después de retirar el polvo con una aspiradora de polvo) y girándolo a 2.000 rpm durante 20 segundos usando un recubridor giratorio, se obtuvo una película de resina suave. Colocando la película de resina obtenida sobre una placa de poliestireno de φ22 mm junto con el cubreobjetos, se obtuvo un recipiente para cultivo celular.

Energía libre de superficie

La energía libre superficial de la película de resina se midió usando un medidor de ángulo de contacto (fabricado por Kyowa Interface Science, Inc., DMO-701). Se obtuvo un ángulo de contacto de agua pura dejando caer 1 µl de agua pura sobre la película de resina y luego fotografiando la imagen de la gota después de 30 segundos. Además, se obtuvo un ángulo de contacto de diyodometano dejando caer 1 µl de diyodometano sobre la película de resina y luego fotografiando la imagen de la gota después de 30 segundos. A partir de los ángulos de contacto obtenidos, la energía libre de la superficie γ , la componente de dispersión γ^d y la componente dipolar γ^p se derivaron usando la teoría de Kaelble-Uy.

Se realizó una prueba en el recipiente para cultivo celular provisto de la película de resina en las siguientes condiciones.

Método para prueba de cultivo celular

Al recipiente obtenido para el cultivo celular se le añadió 1 ml de solución salina tamponada con fosfato y la mezcla se dejó reposar durante 1 hora en una incubadora a 37 °C. Después de retirar la solución salina tamponada con fosfato en el plato, Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células h-iPS 253G1 para realizar el cultivo en presencia de 1 ml de medio TeSR E8 (fabricado por STEM CELL) y 10 µM de inhibidor ROCK (Y27632) en una incubadora a 37 °C bajo una concentración de CO₂ del 5 %. Cada 24 horas, se intercambié el medio retirando 750 µl de medio y añadiendo 250 µl de nuevo TeSR E8 de modo que el inhibidor ROCK (Y27632) se ajustó a 10 µM.

Método para la prueba de cultivo de masa celular

Al recipiente obtenido para el cultivo celular se le añadió 1 ml de solución salina tamponada con fosfato y la mezcla se dejó reposar durante 1 hora en una incubadora a 37 °C. Después de eso, se retiró la solución salina tamponada con fosfato del recipiente de cultivo. Se añadió una colonia confluyente de células h-iPS 252G1 a una placa de 35 mm y luego se añadió 1 ml de disolución tampón de etilendiamina/fosfato 0,5 mM, seguido de reposo a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después de eso, se retiró la disolución tampón de etilendiamina/fosfato, se sembraron $1,0 \times 10^5$ de masa celular triturada a de 50 a 200 um pipeteando con 1 ml de medio TeSR E8 en el recipiente de cultivo para realizar el cultivo en presencia de 1 ml de medio TeSR E8 (fabricado por STEM CELL) y 10 µM de inhibidor ROCK (Y27632) en una incubadora a 37 °C bajo una concentración de CO₂ del 5 %. Cada 24 horas, se intercambié el medio retirando 750 µl del medio y añadiendo 250 µl de nuevo TeSR E8.

Método de evaluación del cultivo

(1) Adherencia inicial

En la prueba de cultivo celular, se obtuvo una imagen celular 24 horas después de la siembra celular usando un

microscopio de contraste de fases (fabricado por Olympus Corporation, IX73) con un aumento de 10×10 . En ese momento, se mostró una imagen de un campo visual que muestra la forma más promedio de adherencia en el recipiente de cultivo. Las imágenes obtenidas se compararon con las muestras 1 a 10 en la figura 4 para evaluar la adherencia inicial teniendo en cuenta el número de células adherentes y la morfología de las células adherentes. En la figura 4, se muestra que el número de células aumenta de las muestras 1 a 8 en este orden. Además, se demuestra que los pseudópodos de las células se alargan y las células están en mejor estado de adherencia, de las muestras 8 a 10 en este orden. Los resultados obtenidos se resumen en las figuras 5 y 6.

(2) Proliferación celular

En la prueba de cultivo celular, se obtuvo una imagen celular 5 días después de la siembra celular usando un microscopio de contraste de fases (fabricado por Olympus Corporation, IX73) con un aumento de 10×4 . En ese momento, se obtuvo una imagen de un campo visual que mostraba la forma más promedio de adherencia en el recipiente de cultivo. La proliferación celular se evaluó comparando la imagen obtenida con las muestras 1 a 10 en la figura 7. En la figura 7, se obtuvo una evaluación más alta a medida que la colonia crecía debido a la proliferación celular. Cuando la colonia crece demasiado en la dirección lateral (la dirección vertical y horizontal en la vista), comienza a acumularse en la dirección vertical (la dirección hacia el frente de la vista), de modo que la transmitancia de luz tiende a disminuir. Los resultados obtenidos se resumen en las figuras 8 y 9.

(3) Mantenimiento de la adherencia

En la prueba de cultivo de masa celular, se evaluó el tiempo durante el cual la masa celular podía mantener la adherencia según los siguientes criterios.

0: Todas las células se desprendieron en menos de 30 minutos después del intercambio de medio.

1: La adherencia se mantuvo durante 30 minutos o más después del intercambio de medio, pero todas las células se desprendieron en menos de 1 hora.

2: La adherencia se mantuvo durante 1 hora o más después del intercambio de medio, pero todas las células se desprendieron en menos de 24 horas.

3: La adherencia se mantuvo durante 24 horas o más después del intercambio de medio.

Se confirmó que la masa celular obtenida mantenía la indiferenciación mediante la prueba de tinción con fosfatasa alcalina (ALP).

Ejemplo 2

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se usó poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 850 y un grado de saponificación del 99 % en mol.

Ejemplo 3

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se usó poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 1,700 y un grado de saponificación del 99 % en mol.

Ejemplo 4

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se usó poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 2.400 y un grado de saponificación del 99 % en mol, y que se usó acetaldehído en lugar de n-butiraldehído (n-BA).

Ejemplo 5

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se usó poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 850, un grado de saponificación del 98 % en mol y un grado de modificación de etileno del 4 % en mol.

Ejemplo 6

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que se usó poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 250 y un grado de saponificación del 99 % en mol, y que contenía el 2 % en mol de unidad estructural que tenía un grupo amino representado por la fórmula (3).

Ejemplo 7

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que se usó poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 1.600 y un grado de saponificación del 99 % en mol, y que contenía el 2 % en mol de unidad estructural que tenía un grupo amino representado por la fórmula (3).

5

Ejemplo 8

En 500 partes en peso de tetrahidrofurano, se disolvieron 100 partes en peso de polivinilacetato que tenía un grado de polimerización de aproximadamente 250 obtenido en el ejemplo 1 y 1 parte en peso de N-vinilpirrolidona para preparar una disolución de resina de copolímero de injerto. En la disolución de resina preparada, se disolvieron 0,05 partes en peso de Irgacure184 (fabricado por BASF) y la mezcla resultante se aplicó sobre una película de PET. El producto recubierto se irradió con luz que tenía una longitud de onda de 365 nm con una cantidad de luz integrada de 2000 mJ/cm² usando un dispositivo transportador UV "ECS301G1" fabricado por Eye Graphics Co., Ltd. a 25 °C para preparar una disolución de resina compuesta. La disolución de resina compuesta preparada se secó a vacío a 80 °C durante 3 horas para preparar una resina compuesta. Se midió el peso molecular promedio en peso de la resina preparada en cuanto a poliestireno mediante el método GPC usando el "modelo de separaciones 2690" fabricado por Waters Corporation como columna. El peso molecular promedio en peso fue de aproximadamente 40.000. La resina compuesta preparada se ajustó a una disolución de butanol al 3 % en peso y la prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1.

10

15

20

Ejemplo 9

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 8 excepto que se añadieron 10 partes en peso de N-vinilpirrolidona a 100 partes en peso de polivinilacetato. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 60.000.

25

Ejemplo 10

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 8 excepto que se añadieron 30 partes en peso de N-vinilpirrolidona a 100 partes en peso de polivinilacetato. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 50.000.

30

Ejemplo 11

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 8 excepto que se añadieron 5 partes en peso de acrilato de tetrahidrofurfurilo a 100 partes en peso de polivinilacetato. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 60.000.

35

Ejemplo 12

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 8 excepto que se añadieron 5 partes en peso de acrilato de metoxietilo a 100 partes en peso de polivinilacetato. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 70.000.

40

Ejemplo 13

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 8 excepto que se añadieron 5 partes en peso de metacrilato de butilo a 100 partes en peso de polivinilacetato. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 60.000.

45

50

Ejemplo 14

En 300 partes en peso de tetrahidrofurano, se disolvieron 75 partes en peso de N-isopropilacrilamida y 25 partes en peso de metacrilato de butilo para preparar una disolución de monómero acrílico. En la disolución de monómero acrílico preparada, se disolvieron 2 partes en peso de Irgacure184 (fabricado por BASF) y la mezcla resultante se aplicó sobre un relleno de PET. El producto recubierto se irradió con luz que tenía una longitud de onda de 365 nm con una cantidad de luz integrada de 2.000 mJ/cm² usando un dispositivo transportador UV "ECS301G1" fabricado por Eye Graphics Co., Ltd. a 25 °C para preparar una disolución de resina acrílica. La disolución de resina acrílica preparada se secó a vacío a 80 °C durante 3 horas para preparar una resina acrílica. La resina acrílica preparada se ajustó a una disolución de butanol al 3 % en peso y la prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1. El peso molecular promedio en peso de la resina acrílica obtenida fue aproximadamente 100.000.

55

60

Ejemplo 15

Se obtuvo una resina acrílica de la misma manera que en el ejemplo 14 excepto que se usaron 90 partes en

65

peso de acrilato de metoxietilo y 10 partes en peso de metacrilato de butilo, en lugar de 75 partes en peso de N-isopropilacrilamida y 25 partes en peso de metacrilato de butilo. La resina acrílica preparada se ajustó a una disolución de butanol al 3 % en peso y la prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1. El peso molecular promedio en peso de la resina acrílica obtenida fue de aproximadamente 80.000.

5

Ejemplo 16

Se obtuvo una resina acrílica de la misma manera que en el ejemplo 14 excepto que se usaron 75 partes en peso de acrilato de metoxietilo y 25 partes en peso de metacrilato de butilo, en lugar de 75 partes en peso de N-isopropilacrilamida y 25 partes en peso de metacrilato de butilo. La resina acrílica preparada se ajustó a una disolución de butanol al 3 % en peso y la prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 90.000.

10

Ejemplo 17

Se obtuvo una resina acrílica de la misma manera que en el ejemplo 14 excepto que se usaron 2 partes en peso de metacrilato de butilo y 98 partes en peso de acrilato de etilo, en lugar de 75 partes en peso de N-isopropilacrilamida y 25 partes en peso de metacrilato de butilo. La resina acrílica preparada se ajustó a una disolución de butanol al 3 % en peso y la prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1. El peso molecular promedio en peso de la resina acrílica obtenida fue de aproximadamente 80.000.

15

20

Ejemplo comparativo 1

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 usando sólo un plato de poliestireno sin usar el material de andamiaje.

25

Ejemplo comparativo 2

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que la cantidad de la segunda adición de n-butiraldehído (n-BA) se cambió de desde 148 g hasta 89 g.

30

Ejemplo comparativo 3

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se usó como resina sintética poli(alcohol vinílico) que tenía un grado promedio de polimerización de 1000 y un grado de saponificación del 98 % en mol.

35

Ejemplo comparativo 4

Se obtuvo una resina de poli(acrilamida) mezclando 100 partes en peso de N-isopropilacrilamida, 75 partes en peso de acetato de etilo y 0,5 partes en peso de azobisisobutironitrilo, seguido de polimerización a 65 °C durante 8 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. Se midió el peso molecular promedio en peso de la resina preparada en cuanto a poliestireno mediante el método GPC usando el "modelo de separaciones 2690" fabricado por Waters Corporation como columna. El peso molecular promedio en peso fue de aproximadamente 90.000 (el grado de polimerización fue de aproximadamente 800). Otras operaciones en la prueba se realizaron de la misma manera que en el ejemplo 1.

40

45

Ejemplo comparativo 5

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo comparativo 4 excepto que se usaron 100 partes en peso de acrilato de etilo en lugar de 100 partes en peso de N-isopropilacrilamida.

50

Ejemplo comparativo 6

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo comparativo 4 excepto que se usaron 100 partes en peso de metacrilato de butilo en lugar de 100 partes en peso de N-isopropilacrilamida. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 90.000.

55

Ejemplo comparativo 7

La prueba se realizó de la misma manera que en el ejemplo 8 excepto que se añadieron 70 partes en peso de N-vinilpirrolidona a 30 partes en peso de polivinilacetato. El peso molecular promedio en peso de la resina obtenida fue de aproximadamente 90.000.

60

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 1 y 2. Las figuras 5 y 6 muestran micrografías de contraste de fases de las células 24 horas después de la siembra. Las figuras 8 y 9 muestran micrografías de contraste de

65

fases de las células 5 días después de la siembra. No se observaron células diferenciadas en ninguno de los ejemplos y ejemplos comparativos.

Tabla 1

	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo
Resina sintética	Grado de acetilización (% en mol)	71	68	65	66	64	77	76	70	85	54	54	
	Cantidad de grupo acetilo (% en mol)	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	
	Cantidad de grupo hidroxilo (% en mol)	28	31	34	33	30	20	21	28	25	21	21	
	Contenido de unidad estructural que tiene grupo amina (1) (% en mol)	-	-	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-	-	
	Contenido de unidad estructural que tiene estructura de imina (2) (% en mol)	-	-	-	-	-	1,7	1,7	-	-	-	-	
	Contenido de unidad estructural que tiene estructura de amida (3) (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	9	24	
	Contenido total de unidad estructural que tiene estructura de amina, unidad estructural que tiene grupo imina y unidad estructural que tiene estructura de amida ((1) + (2) + (3)) (% en mol)	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	1	9	24	
	Grado de polimerización	250	850	1700	2400	850	250	1600	250	250	250	250	
	Energía libre superficial γ^d	32,5	32,6	33,5	31,3	34,2	34,2	34,8	33,0	33,0	35,7	36,2	
	γ^p	3,5	3,7	3,5	4,6	3,3	3,3	3,6	3,2	3,2	2,6	2,2	
Adherencia inicial	5	5	6	6	6	8	8	8	9	9	7		
Proliferación celular	4	5	6	6	5	6	7	9	9	9	6		
Mantenimiento de la adherencia	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	2		

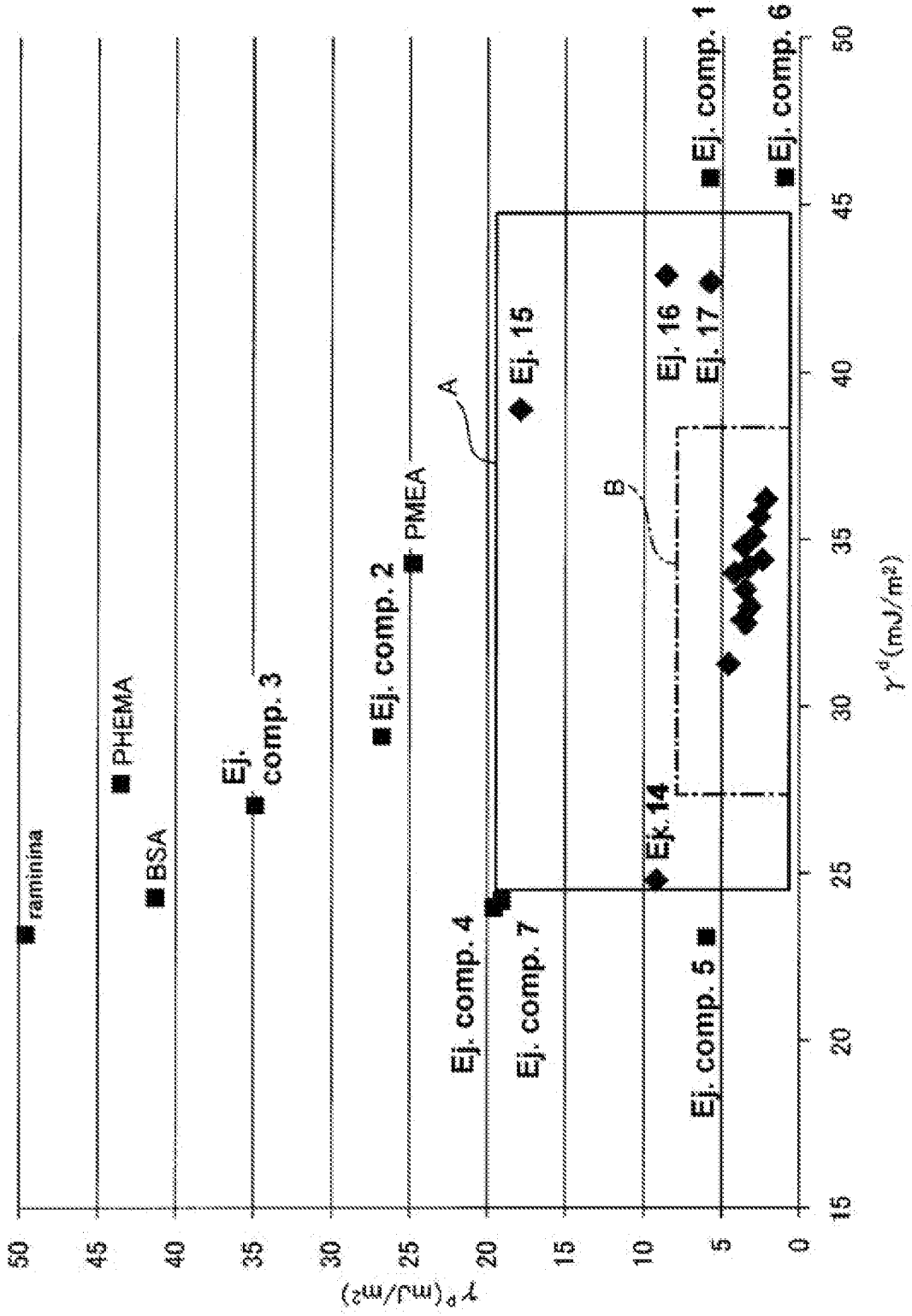
Tabla 2

	Ejemplo 1.1	Ejemplo 1.2	Ejemplo 1.3	Ejemplo 1.4	Ejemplo 1.5	Ejemplo 1.6	Ejemplo 1.7	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7	
Resina sintética	Grado de acetilación (% en mol)	68	68	-	-	-	-	-	40	0	-	-	-	21	
	Cantidad de grupo acetilo (% en mol)	1	1	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	0	
	Cantidad de grupo hidroxilo (% en mol)	27	27	-	-	-	-	-	57	98	-	-	-	8	
	Contenido de unidad estructural que tiene grupo amina (1) (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Contenido de unidad estructural que tiene estructura de imina (2) (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Contenido de unidad estructural que tiene estructura de amida (3) (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71	
	Unidad de acrilato de tetrahidrofurfurolo (% en mol)	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Unidad de acrilato de metoxietilo (% en mol)	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Unidad de metacrilato de butilo (% en mol)	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Contenido total de unidad estructural que tiene estructura de amina, unidad estructural que tiene grupo imina y unidad estructural que tiene estructura de amida ((1) + (2) + (3)) (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71
	Grado de polimerización	250	250	250	-	-	-	-	-	250	1000	-	-	-	250
	Contenido de unidad estructural que tiene estructura de amida (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
	Unidad de metacrilato de butilo (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
	Unidad de acrilato de metoxietilo (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Unidad de acrilato de etilo (% en mol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
Grado de polimerización	-	-	-	250	250	250	250	-	-	-	800	600	550	250	
Energía libre superficial	γ^d	35.1	34	34.4	24.3	38.9	42.9	42.7	45.8	28.9	24.0	23.1	45.7	-	
	γ^p	2.9	4.2	2.4	9.2	17.9	8.6	5.8	5.8	26.8	19.6	6.0	1.0	-	
Evaluación para el cultivo	Adherencia inicial	7	8	8	4	4	4	3	4	3	2	2	4	2	
	Proliferación celular	8	8	8	3	3	3	1	2	1	1	1	1	1	
	Mantenimiento de la adherencia	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	

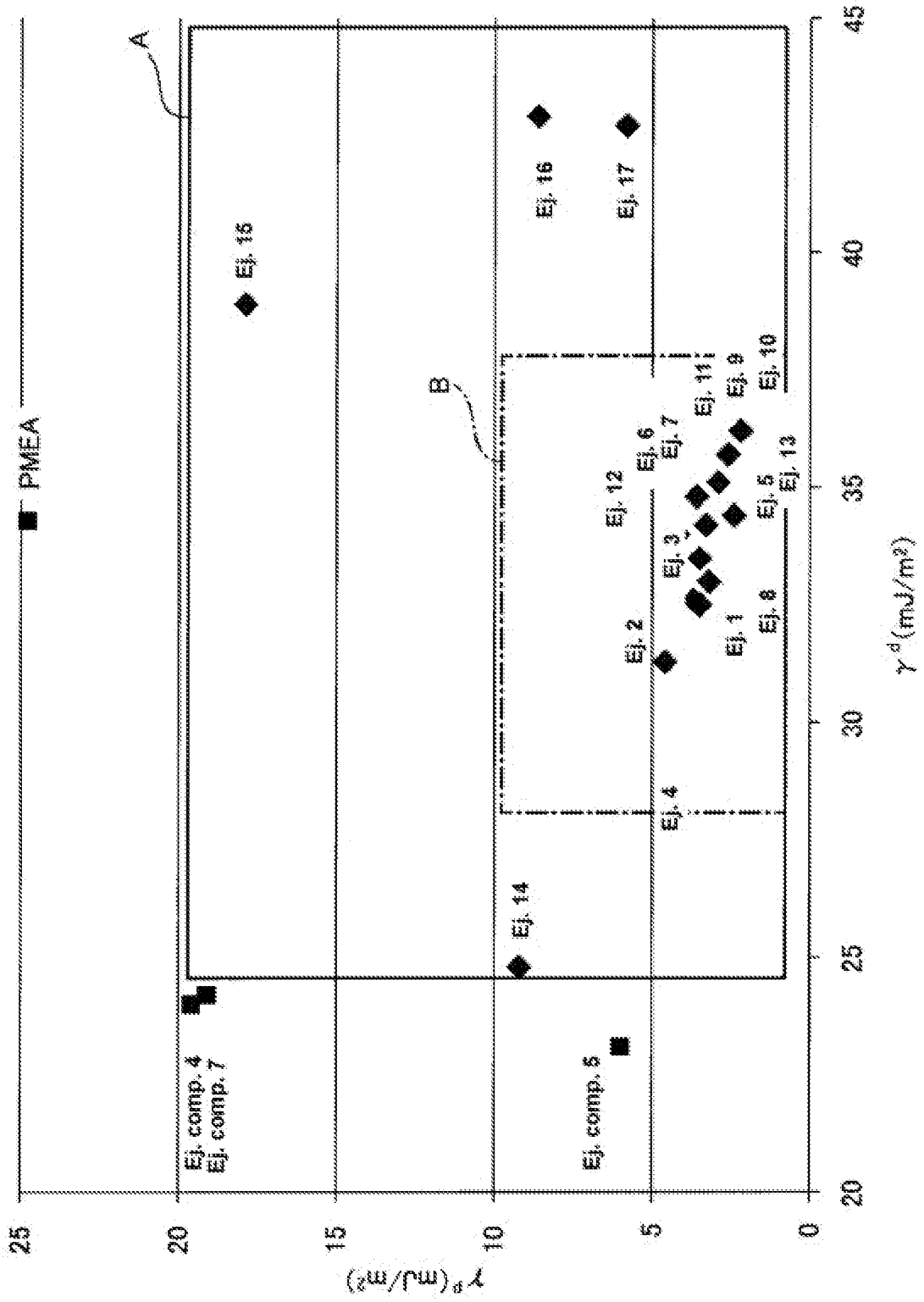
REIVINDICACIONES

1. Material de andamiaje para cultivar una célula madre, que tiene
- 5 una componente de dispersión γ^d de energía libre superficial de 28,0 o más y menos de 38,0, y una componente dipolar γ^p de energía libre superficial de 1,0 o más y menos de 10,0,
- 10 en el que el material de andamiaje comprende una resina sintética, la resina sintética contiene al menos uno cualquiera de un esqueleto de polivinilacetato y un esqueleto de éster poli(met)acrílico.
- 15 2. Material de andamiaje para cultivar una célula madre según la reivindicación 1, en el que la resina sintética es una resina de polivinilacetato.
3. Material de andamiaje para cultivar una célula madre según la reivindicación 2, en el que la resina de polivinilacetato contiene como unidad estructural al menos una seleccionada del grupo que consiste en una unidad estructural que tiene una estructura de amina, una unidad estructural que tiene una estructura de imina y una
- 20 unidad estructural que tiene una estructura de amida.
4. Material de andamiaje para cultivar una célula madre según la reivindicación 3, en el que la resina de polivinilacetato tiene un contenido total de la unidad estructural que tiene una estructura de amina, la unidad estructural que tiene una estructura de imina y la unidad estructural que tiene una estructura de amida del 0,1 %
- 25 en mol o más y el 30 % en mol o menos.
5. Material de andamiaje para cultivar una célula madre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula madre es una célula madre pluripotente.
- 30 6. Recipiente para cultivar una célula madre, que comprende el material de andamiaje para cultivar una célula madre según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en al menos una parte de una región de cultivo celular.
7. Método para cultivar una célula madre, usando el material de andamiaje para cultivar una célula madre según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 8. Método para cultivar una célula madre según la reivindicación 7, que comprende una etapa de sembrar una masa celular en el material de andamiaje para cultivar una célula madre.

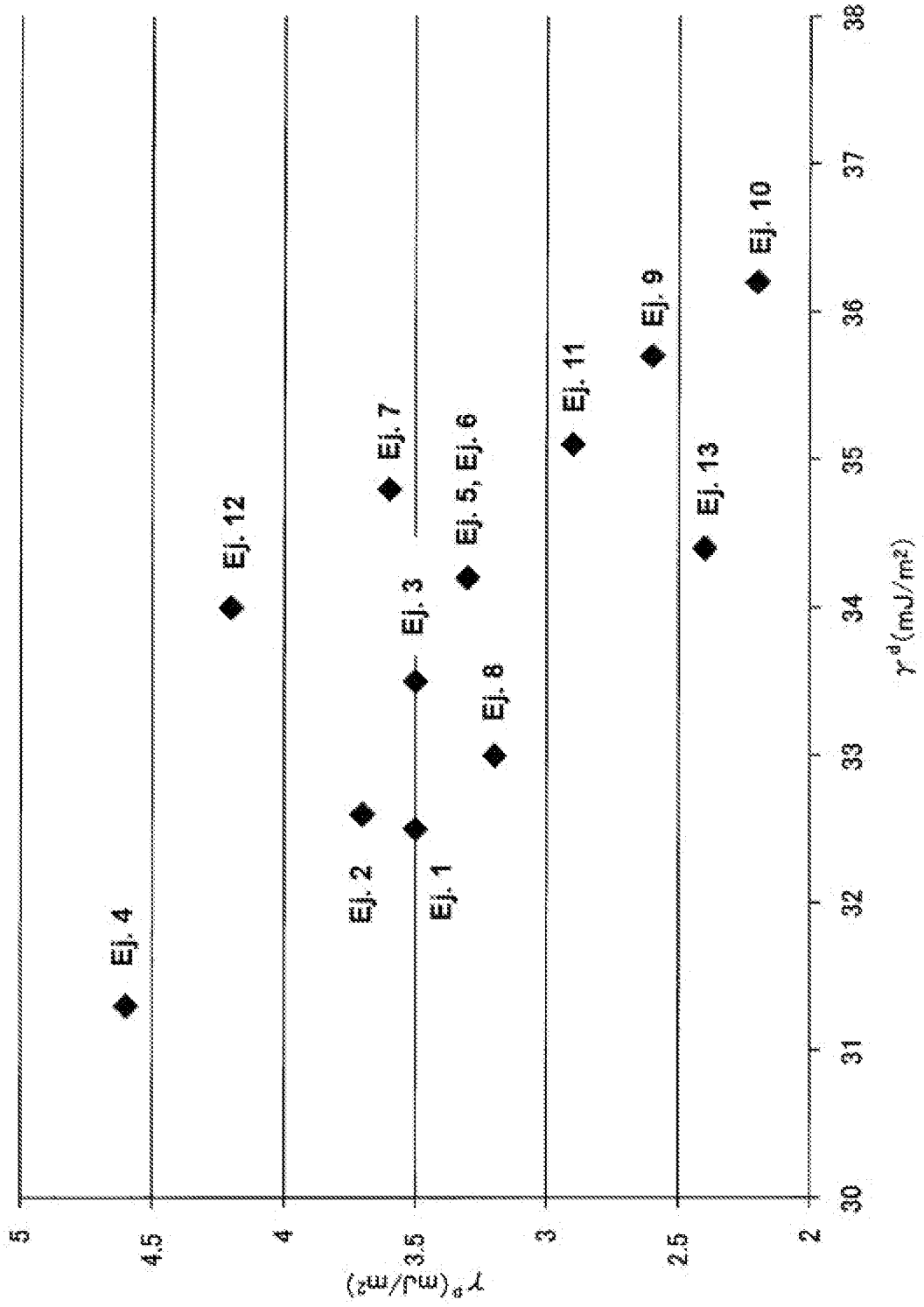
[FIG. 1.]



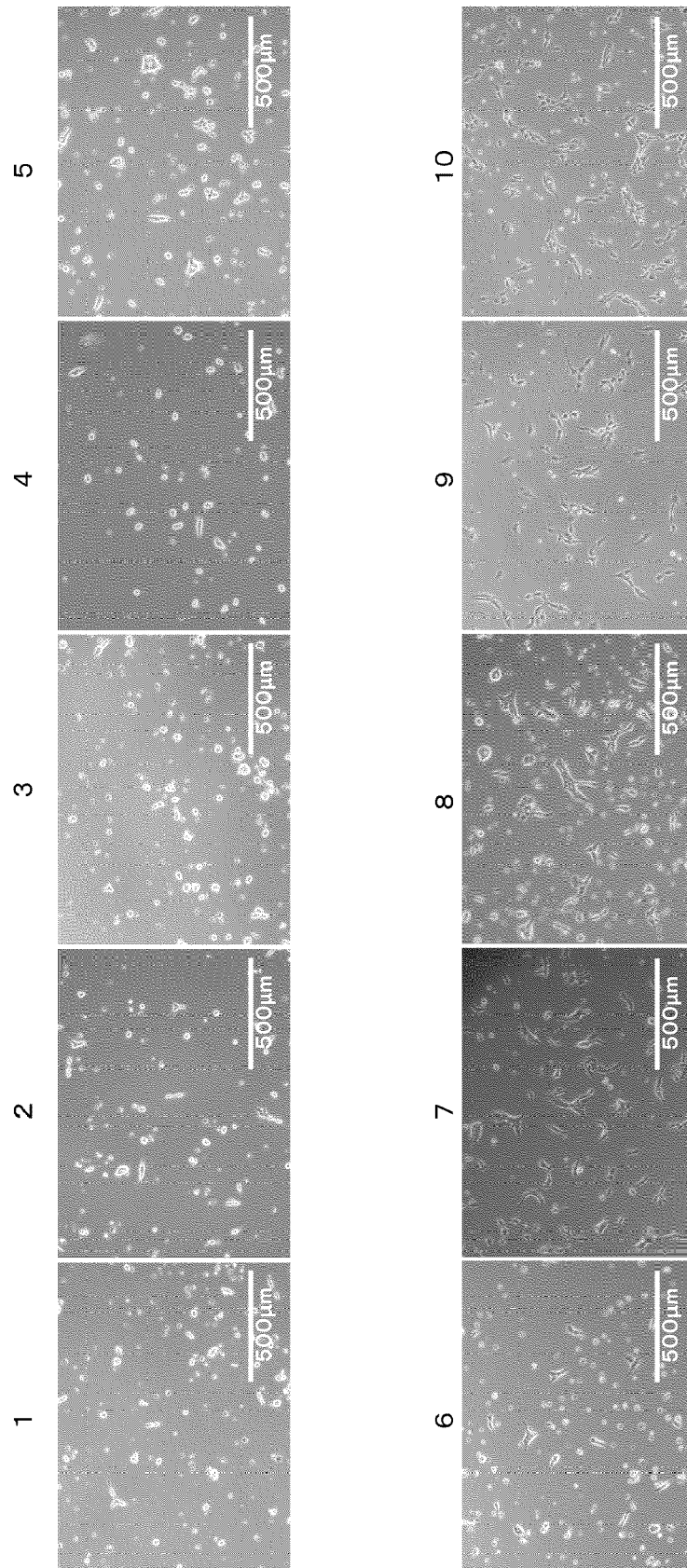
[FIG. 2.]



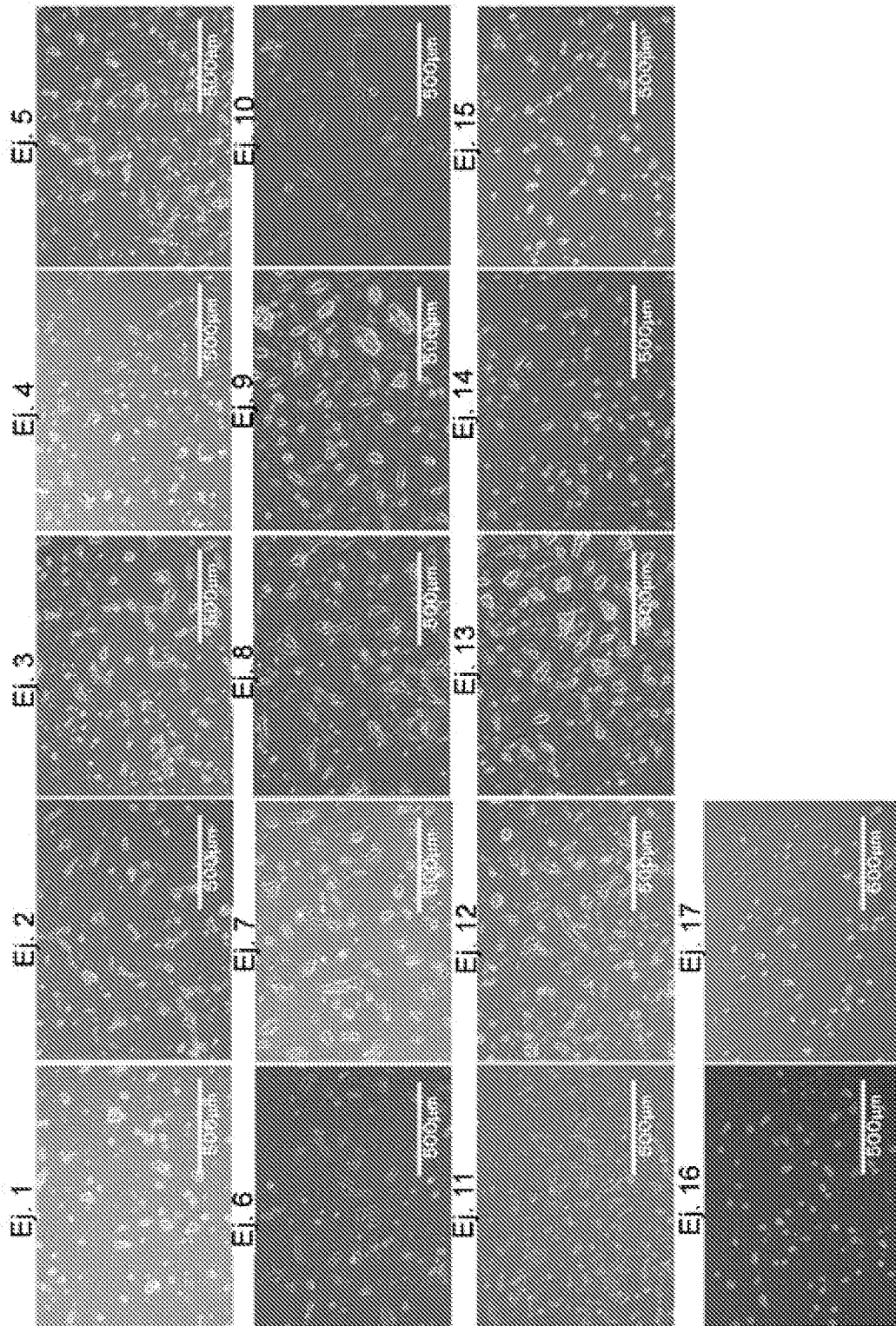
[FIG. 3.]



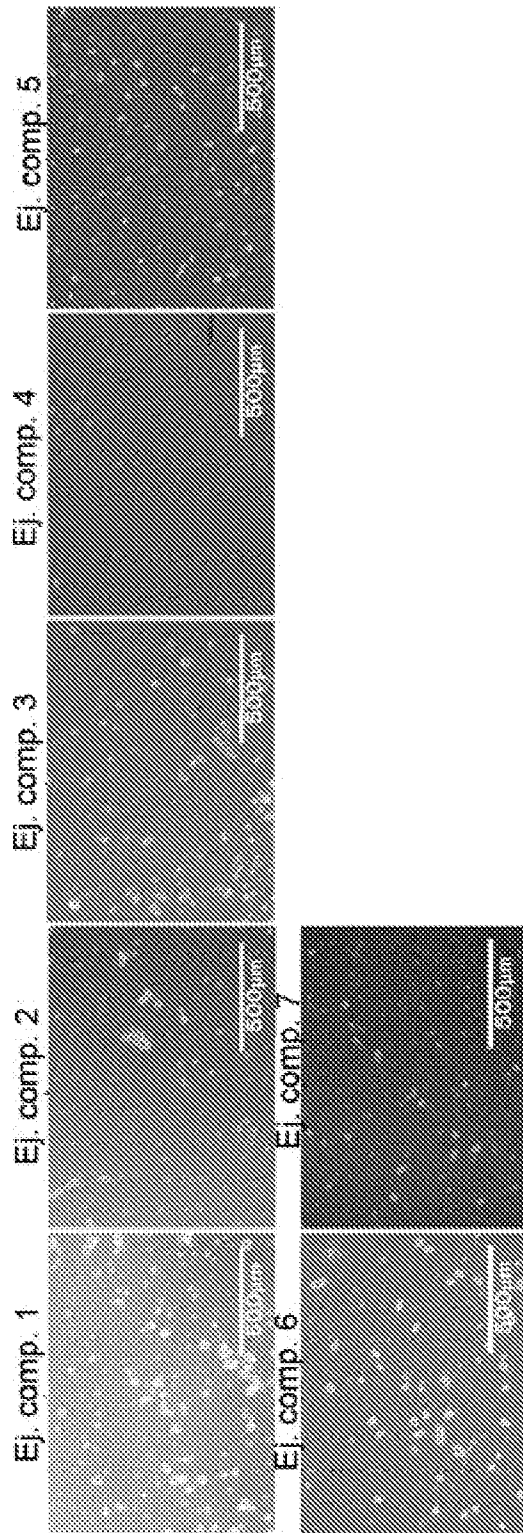
[FIG. 4.]



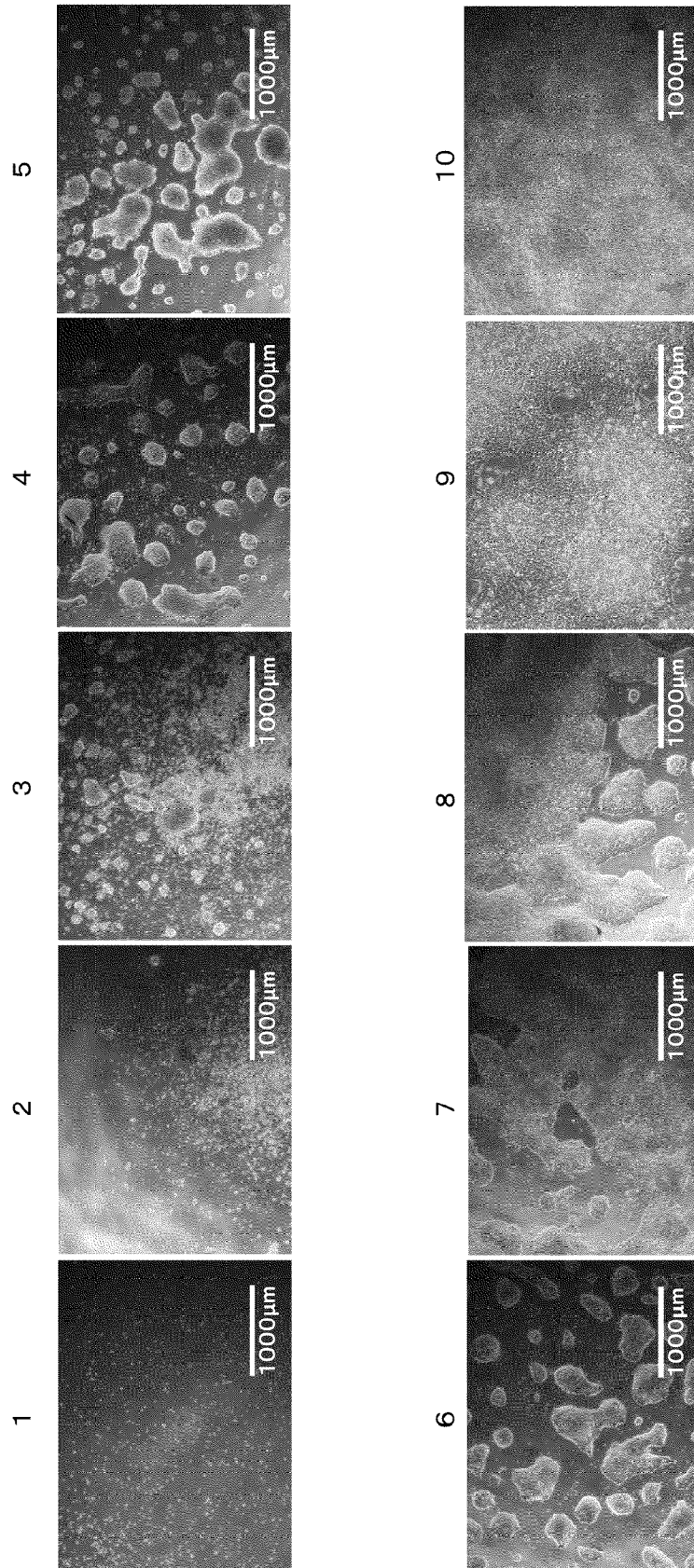
[FIG. 5.]



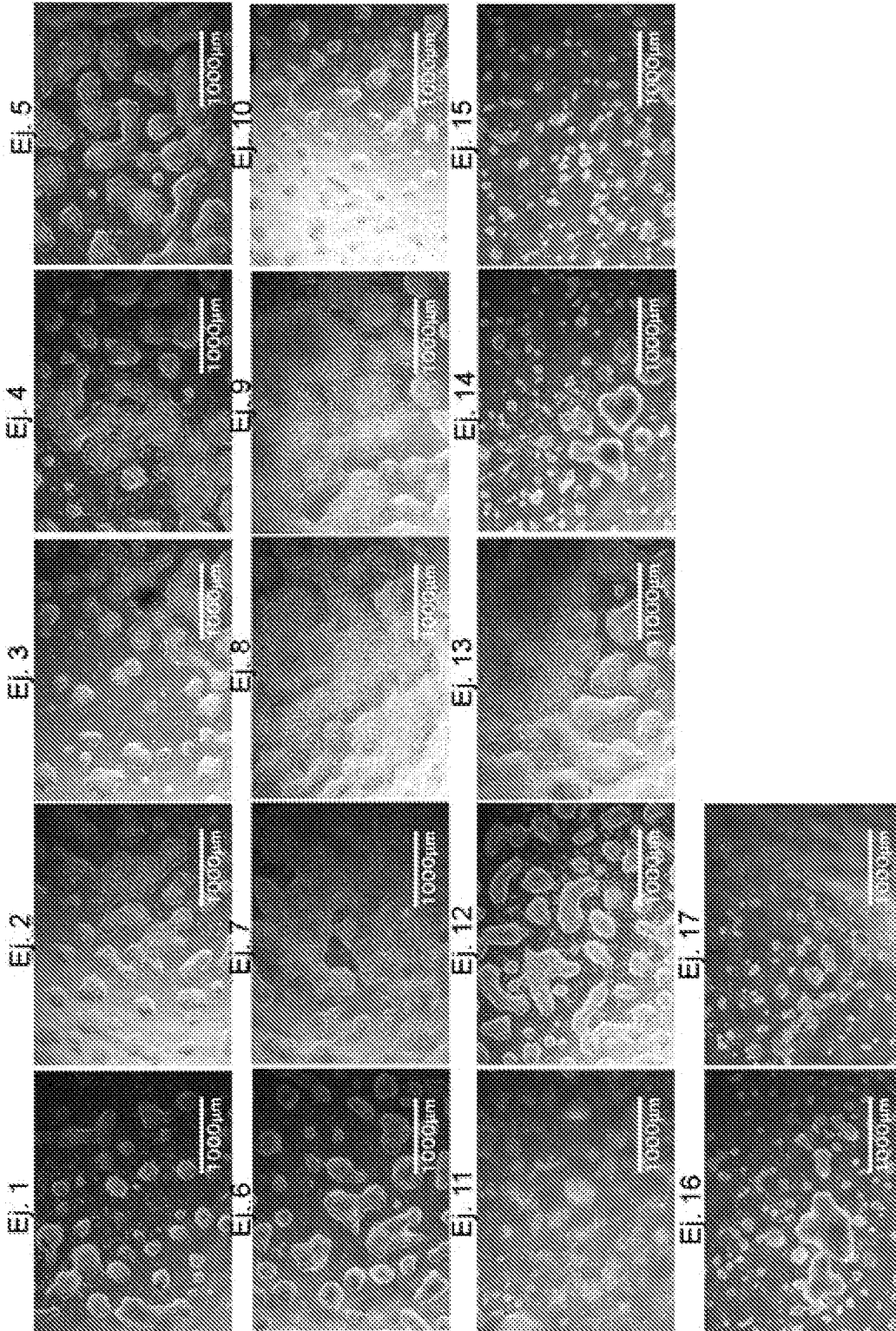
[FIG. 6.]



[FIG. 7.]



[FIG. 8.]



[FIG. 9.]

