

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-509960

(P2012-509960A)

(43) 公表日 平成24年4月26日(2012.4.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C08J 9/26 (2006.01)</b>	C08J 9/26 102	4B029
<b>C12M 1/00 (2006.01)</b>	C08J 9/26 CFH	4B065
<b>C12N 1/00 (2006.01)</b>	C12M 1/00 A	4F074
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 1/00 A	
	C12N 5/00 102	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2011-537638 (P2011-537638)  
 (86) (22) 出願日 平成21年11月20日 (2009.11.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年7月13日 (2011.7.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/065263  
 (87) 国際公開番号 W02010/059902  
 (87) 国際公開日 平成22年5月27日 (2010.5.27)  
 (31) 優先権主張番号 61/117,366  
 (32) 優先日 平成20年11月24日 (2008.11.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/260,456  
 (32) 優先日 平成21年11月12日 (2009.11.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 397068274  
 コーニング インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 148  
 31 コーニング リヴァーフロント プ  
 ラザ 1  
 (74) 代理人 100073184  
 弁理士 柳田 征史  
 (74) 代理人 100090468  
 弁理士 佐久間 剛  
 (72) 発明者 スウ, ホイ  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 148  
 14 ビッグ フラッツ メドウ ドライ  
 ヴ 20

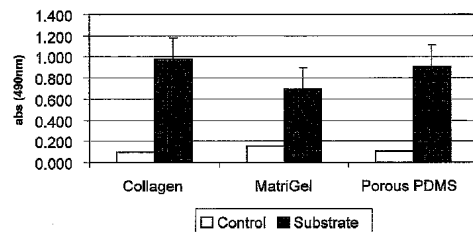
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3D細胞培養物品およびその方法

(57) 【要約】

光学的に透明な多孔質高分子組成物、その組成物を含む物品、並びにその組成物の製造方法、および例えば、ここに定義された細胞機能または遺伝子発現を調節するまたは促進することを含む細胞培養のためのその組成物の使用方法が開示されている。

Fig. 6



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

三次元多孔質細胞培養物品を製造する方法において、  
少なくとも1つのモノマー、オリゴマー、またはそれらの混合物と、少なくとも1種類の粒状細孔形成剤とを含む混合物を重合させて、最密充填粒子相を有する連続高分子基質を形成し、

得られた固体基質を処理して、該基質から前記最密充填粒子相を除去する、  
各工程を有してなる方法。

**【請求項 2】**

三次元細胞培養物品において、

相互接続された多孔質網目構造を有する高分子塊であって、細孔径とそれに対応する間隙の単峰性分布、より大きい細孔およびより小さい細孔からなる細孔径とそれらに対応する間隙の二峰性分布、またはそれらの組合せからなる細孔を含む高分子塊、  
を有してなり、実質的に光学的に透明であることを特徴とする物品。

10

**【請求項 3】**

請求項 1 記載の方法により調製された三次元細胞培養物品であって、

基体、および

前記基体上に支持された相互接続された多孔質網目構造を有する高分子層、  
を有してなり、前記高分子層が、連続または藩連続空隙相を有する連続高分子基質を含むことを特徴とする物品。

20

**【請求項 4】**

細胞培養方法において、

請求項 3 記載の細胞培養物品を培地と、次いで、生きている細胞と接触させる工程を有してなる方法。

**【請求項 5】**

前記生きている細胞の遺伝子発現レベルが、前記高分子層のヤング率の剛性と共に増加し、前記高分子層が、約 0.1 MPa から約 15 MPa のヤング率を有することを特徴とする請求項 4 記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【優先権】**

30

**【0001】**

本出願は、2008年11月24日に提出された米国仮特許出願第61/117366号、および2009年11月12日に提出された米国仮特許出願第61/260456号の恩恵を主張するものである。優先権書類の内容およびここに述べられた任意の出版物、特許、または特許書類の全開示がここに引用される。

**【技術分野】****【0002】**

本開示は、細胞培養物品およびその物品を製造する方法とその物品を細胞培養に使用する方法に関する。

**【発明の概要】**

40

**【課題を解決するための手段】****【0003】**

本開示は、相互接続された細孔および間隙の網目構造を有する高多孔質三次元(3D)組成物、および培地や細胞の有無にかかわらず、基体上に被覆されたときなどに、光学的透明度を有する細胞培養物品などの、その組成物を含む物品を提供する。本開示はまた、高多孔質3D組成物およびその物品を製造する方法、並びにその物品により、例えば、細胞機能または遺伝子発現を調節すること、および細胞培養モニタリングを含む、細胞培養方法を提供する。

**【図面の簡単な説明】****【0004】**

50

【図 1】反射型共焦点顕微鏡により結像された相互接続された細孔および間隙を有する例示の多孔質ポリジメトキシシラン ( P D M S ) 物品を示す画像

【図 2 A】表面焦点の多孔質 P D M S の顕微鏡画像

【図 2 B】図 2 A の多孔質 P D M S 細胞培養物品内の培養中に形成された H e p G 2 スフェロイドを示す画像

【図 3 A】反射型共焦点顕微鏡により結像された相互接続された細孔構造を有する多孔質 P D M S 物品の例示のサンプルを示す画像

【図 3 B】530 マイクロメートルの深さでの Q d o t ( 登録商標 ) がドープされた図 3 A のサンプルの二光子蛍光画像

【図 4】最密単峰性の大きい細孔形成剤集合体の例示の説明図

10

【図 5】最密二峰性の大小細孔形成剤集合体の例示の説明図

【図 6】肝細胞の細胞株 H e p G 2 C 3 A の 24 時間の培養後の細胞付着 L D H アッセイの評価結果を示すグラフ

【図 7】比較の物品および本発明の多孔質物品 ( P D M S ) における H e p G 2 の 7 日間の培養後の細胞付着 L D H アッセイの結果を示すグラフ

【図 8】誘導因子のある場合とない場合の比較のコラーゲン物品と本発明の多孔質物品 ( P D M S ) における C Y P 3 A 4 および C Y P 1 A 2 初代細胞のヒト初代肝細胞培養の L D H アッセイの結果を示すグラフ

【図 9】正規化基準としてのコラーゲンに対する本発明の組成物のヒト初代肝細胞の遺伝子発現の分析結果を示すグラフ

20

【図 10】様々な培養表面による培養後の生存ヒト肝細胞の数を比較するグラフ

【図 11】様々な細胞サイズを有する多孔質 P D M S 基体においてリファンピンにより誘導されたヒト肝細胞の遺伝子発現レベルを示すグラフ

【図 12】様々な細孔サイズを有し、様々な剛性 ( 混合比 ) を有する、多孔質 P D M S 基体において培養したヒト肝細胞の選択的遺伝子発現品質を示すグラフ

【図 13】様々な開示された多孔質 P D M S 基体に冠する測定した係数の関係 ( 応力対歪み ) を示すグラフ

【図 14】モノマーまたはオリゴマー材料の硬化剤に対する混合比により決定される基体の剛性の関数としての、図 13 における多孔質 P D M S 基体の曲線の測定した係数の関係を示すグラフ

30

【発明を実施するための形態】

【0005】

本開示の様々な実施の形態を、もしあれば、図面を参照してより詳しく説明する。様々な実施の形態への参照は本発明の範囲を制限するものではなく、本発明の範囲は、ここに添付された特許請求の範囲によってしか制限されない。その上、本明細書における実施例は、制限的ではなく、請求項に記載された発明の多くの可能な実施の形態のいくつかを単に述べたものである。

【0006】

定義

「細孔」は、例えば、高分子物品の表面にある少なくとも 1 つの外側開口を有する固体高分子の表面、本体、または表面と本体の両方にある空洞または空隙を称する。

40

【0007】

「間隙」は、例えば、高分子物品の表面にある直接的な外側開口を有さない、すなわち、細孔ではない、固体高分子の本体内の空洞または空隙を称するが、隣接するまたは近隣の「細孔」、「間隙」、またはそれらの組合せへの 1 つ以上の連結または接続によって、高分子物体の外面への間接的な外側開口または経路を有していてもよい。

【0008】

「多孔質網目構造」は、例えば、本開示による製造中に組成物から粒状材料が除去された後に残る物品の、細孔と間隙からなる、総空隙堆積または合計空隙体積を称する。

【0009】

50

「気孔率 (porosity)」は、例えば、ある材料の細孔と間隙の合計間隙体積の、その材料の塊の体積に対する比を称する。

【0010】

「連続空隙相」は、別の空隙に1つしか接続を有さない「袋小路」または「出口なし」、または「孤立した空隙」、すなわち相互接続のない空隙が実質的にない、相互接続された多孔質網目構造を有する物品を称する。半連続空隙相は、約1から約20体積%などの、上述した「袋小路」または「孤立した空隙」をある程度の量で有してもよい相互接続された多孔質網目構造を有する物品を称する。上述した網目構造特性を有する半連続空隙相に遭遇した場合またはそれが望ましい場合、細孔形成剤の選択には、例えば、拡散ガスまたは昇華性固体などの一時的細孔形成剤 (fugitive pore-former)、または高分子相に光学的に一致したまたは類似の透明の中空粒子が考えられる。

10

【0011】

ここに開示された「再構成可能な粉末」は、液体で処理したときに、開示された多孔質相互接続網目構造特性を有する凝集した高分子塊を生じる粉末を称する。

【0012】

「光学密度」、「OD」などの用語は、例えば、培地の存在下または不在下において、所定の波長での所定の長さに関する本発明の物品の多孔質高分子材料の透過率の尺度を称する。

【0013】

「保持率」は、ある期間後に表面に付着しているまたは留まっている、培養表面に平板培養した生存細胞数の割合を称する。

20

【0014】

「誘導因子 (inducer)」は、細胞または有機体に、発生信号に応答して酵素または一連の酵素の生合成を促進させることのできる分子または同様の作用物を称する。

【0015】

「アッセイ」、「アッセイ法」などの用語は、リガンドの候補化合物、培地、基体被覆、または同様の検討事項などの、細胞の成長特性または外因性刺激に対する応答の存在、不在、量、程度、動力学、力学、またはタイプ等を決定するための分析を称する。

【0016】

「付着する」、「付着」、「粘着」、「粘着した」、「粘着性」、「固定化された」などの用語は、一般に、物理吸収、化学結合などのプロセス、またはそれらの組合せなどにより、ある表面に、表面修飾物質、相溶化剤 (compatibilizer)、誘導因子、細胞、リガンドの候補化合物、および本開示の同様の実在物を固定化することまたは固定することを称する。特に、「細胞付着」、「細胞粘着」などの用語は、細胞の培養、または細胞のバイオセンサ表面 (コーニング社の E p i c (登録商標) 器具等の装置などの) または培養表面などの表面との相互作用などにより、細胞の表面との相互作用または細胞の表面への結合を称する。

30

【0017】

「粘着細胞」は、基体の外面と関連したまま、その上に固定化されたまま、またはそれとある種の接触したままである、原核細胞または真核細胞などの細胞または細胞株もしくは細胞系を称する。そのようなタイプの細胞は、培養後に、多くの細胞に基づくアッセイに前もって必要なプロセスである、洗浄プロセスおよび培地交換プロセスに耐えるまたは生存することができる。「弱い粘着細胞」は、細胞培養中に基体の表面と弱く相互作用する、または結びつく、または接触する、原核細胞または真核細胞などの細胞または細胞株もしくは細胞系を称する。しかしながら、これらのタイプの細胞、例えば、ヒト胎児腎 (HEK) 細胞は、洗浄または培地交換などの物理的に攪乱する手法によって、基体の表面から容易に解離する傾向にある。「懸濁細胞」は、培養中に基体の表面に細胞が付着も粘着もしない培地中で培養されることが好ましい細胞または細胞系を称する。「細胞培養」、「細胞培養する」は、管理された条件下で原核細胞または真核細胞のいずれかを増殖させるプロセスを称する。「細胞培養」は、多細胞性の真核細胞、特に、動物細胞に由来の

40

50

細胞の培養だけでなく、複合組織、臓器、病原体などの系の培養も含み得る。

【0018】

「細胞」などの用語は、生命の基本機能の全てを単独でまたは他の同様の塊と相互作用して果たし、合成細胞構造、細胞モデル系、および同様の人工細胞系を含む独立して機能できる生命体の最小構造単位を形成できる、必要に応じて1つ以上の原子核および様々な他の細胞小器官を含む、半透膜により囲まれた原形質の小さな、通常は微視的な塊を称する。

【0019】

「細胞系」などの用語は、細胞の集まりを称し、互いに相互作用し、それゆえ、生物学的、生理学的、または病態生理学的機能を果たす複数のタイプの細胞（または1つのタイプの細胞の差別化された形態）を含み得る。そのような細胞系の例としては、臓器、組織、幹細胞、分化肝細胞、および同様の細胞系が挙げられる。

10

【0020】

当業者に公知の略語（例えば、時間に「h」または「hr」、グラムは「g」または「gm」、ミリリットルは「mL」、および室温は「rt」、ナノメートルは「nm」などの略語）を使用してよい。

【0021】

例えば、ある成分についての「質量パーセント」、「質量%」、「質量でのパーセント」などの用語は、別記しない限り、百分率として表される、その成分が含まれる組成物の総質量に対する、その成分の質量の比率を称する。

20

【0022】

「含む(include; includes)」などの用語は、包括的であって排他的ではない、含む(comprising)または以下に限られないが含む(including but not limited to)ことを意味する。

【0023】

「約」の修飾、例えば、本開示の実施の形態を記載する際に利用される、組成物中の成分の量、濃度、体積、プロセス温度、プロセス時間、収率、流量、圧力、および同様の値、並びにその範囲は、例えば、化合物、組成物、濃縮物または使用の配合物を製造するのに使用される典型的な測定および取扱い手法により；これらの手法における不慮の誤りにより；ある方法を実施するために使用される出発材料または成分の製造、供給源、または純度における差により；生じ得る数量の変動を称する。「約」という用語は、例えば、特定の初期濃度または混合物を有する組成物、配合物、または細胞培養の熟成のために異なる量、および特定の初期濃度または混合物を有する組成物または配合物の混合または処理のために異なる量も包含する。「約」という用語により修飾された場合、約が付けられた請求項は、これらの量と同等物を含む。

30

【0024】

実施の形態における「から実質的になる」は、例えば、開示の組成物、組成物、配合物を製造するまたは使用方法、または基体、細胞培養物品、および同様の物品、デバイス、または装置の表面上の組成物を称し、特定の反応体、特定の成分、特定の添加物または要素、特定の試薬、特定の細胞または細胞株、特定の表面改質剤または条件、特定のリガンドまたは薬物の候補、または同様の構造、材料、または選択されたプロセス変数などの、請求項に列記された成分または工程に加え、開示の組成物、物品、装置、および製造方法と使用方法の基本性質と新規の性質に実質的に影響を与えない他の成分または工程を含み得る。開示の成分または工程の基本性質に実質的に影響するかもしれない項目、または本開示に望ましくない特徴を与えるかもしれない項目としては、例えば、細胞培養組成物または物品と液体培地との間の光学的不一致、組成物から実質的に除去できない光学的不一致のまたは不透明な捕捉された細孔形成粒子、細胞培養組成物または物品を生物学的、化学的、または光学的に汚染し得る細孔形成粒子、および同様の検討事項と特徴が挙げられる。

40

【0025】

50

単数形はここでは、別記しない限り、少なくとも1つ、または1つ以上を意味する。

【0026】

「随意的な」、「必要に応じて」などの用語は、その後に記載された事象または状況が生じ得るまたは生じ得ないこと、並びにその記載が、前記事象または状況が生じる場合と生じない場合を含むことを意味する。例えば、「随意的な成分」という句は、その成分が存在しても存在しなくても差し支えないことを意味し、その開示が、その成分を含む実施の形態と含まない実施の形態の両方を含むことを意味する。

【0027】

成分、要素、添加剤、細胞タイプ、病原体、および同様の態様について開示された特定の値と好ましい値、並びにその範囲は、説明だけのためであり、それらは、他の定義された値または定義された範囲内の他の値を排除するものではない。本開示の組成物、装置、および方法は、ここに記載された値、特定の値、より特定の値、および好ましい値の任意の値または任意の組合せを有するものが挙げられる。

10

【0028】

この開示は、より厳密にin-vivo様挙動に似ている細胞機能を有する、哺乳類細胞、および同様の細胞に使用するためなどの、非動物系細胞培養組成物、物品を提供する。例えば、肝細胞のin-vitro培養は、薬剤開発プロセス（例えば、予測ADMETox）に有用であり得る。何故ならば、薬剤は、より毒性の強い中間体に転化され、解毒プロセスの一部として肝臓中のシトクロム（CY）P450酵素による代謝後に他の化合物（例えば、薬剤）と相互作用し得るからである。しかしながら、in-vitroにおいて初代肝細胞は、薬剤分子を代謝する細胞の能力を主に制御する、アルブミン産生およびCYP450活性を含む機能を急激に失い得る。これまで、これらの細胞に関する毒性と薬剤相互作用の研究は、典型的に、限定的であり、それほど参考にならなかった。

20

【0029】

ある実施の形態において、本開示は、3D細胞培養、細胞検出、または3D培養における細胞モニタリングのための合成組成物を提供する。この組成物は、細胞が増殖し、生きている実在物の外部でその自然の機能性を果たす細胞培養環境を提供し、これらの細胞培養組成物は、例えば、改善された細胞イメージング侵入深さを有することによって、基体内の細胞活性の検出を向上させることのできる適切な光学的仕様を有するように選択または設計できる。

30

【0030】

ある実施の形態において、本開示の多孔質高分子物品は、3D細胞培養に有用であり、単独でまたは組合せで、以下の特徴の内の1つ以上を提供する。培養された細胞は、その物品の相互接続された多孔質構造を通して、自由に移行する、連絡する、または互いに接触することができる。培養された細胞は、多孔質物品内の間隙または細孔内で、ある明確なサイズのスフェロイドへと増殖し得る。スフェロイドのサイズは、細孔形成材料の慎重な選択により基体の間隙または細孔の分布を規定することによって調節できる。ある実施の形態において、細胞間での連絡を向上させ、多孔質物品内の網目構造の相互接続されたチャンネルへの栄養素の侵入を向上させ、そのチャンネルからの廃物の輸送を向上させるために、多孔質網目構造の間隙を含む2つ（すなわち、二峰性）またはそれより多い（すなわち、多峰性）粒径分布を有する多孔質物品を製造することができる。細胞または細胞体の増殖に有利に働くように、大きな間隙および細孔サイズを有する多孔質物品を設計することができ、例えば、細胞の連絡、栄養素の交換、および廃物の交換を向上させるために、小さな間隙および細孔サイズを設計することができる。多孔質物品は、例えば、多孔質固形物または多孔質ゲルであって差し支えなく、これは、都合の良い連続または半連続培地交換を含む、培地と容易に組み合わせ、それから分離することができる。所望であれば、多孔質物品は、その物品の屈折率を培地の屈折率とまたはその近くに合わせることによって、培地中に浸漬されたときにほとんど透明にすることができる。ほとんど透明な物品は、例えば、その物品の内部に存在する細胞の光学的結像のためにより深い侵入を可能にする。ポリジメチルシロキサン（PDMS）から製造された本発明の物品における二光

40

50

子蛍光顕微鏡法のイメージング侵入(imaging penetration)は、例えば、約100から約1,000マイクロメートルに到達でき、例えば、ポリビニルアルコール(PVA)系多孔質物品におけるたった約90マイクロメートルと比べて、約500マイクロメートルより深く到達できる。ある実施の形態において、本開示は、それほど望ましくない光学的性質を有するPVAなどの高分子についてさえ、光学的透明性解決策を提供する。PDMSは、細胞増殖のための非常に安定であり、生物学的適合性材料である。最近、コーニング社(Corning, Inc.)は、3D細胞培養のためにUltraWeb(商標)表面を導入した(www.corning.com/Lifesciences/technical\_information/techDocs/UltraWeb\_Reference\_s.pdfを参照のこと)。「UltraWeb」は、ナノファイバ構造からなる合成膜である。細胞は、膜表面の上部で広がり、増殖する。本開示は、「UltraWeb」表面を有する細胞培養システムに基づくin-vitro3D細胞培養システムと比べて、優れた性質を有する改善された3D細胞培養物品および方法を提供する。

10

#### 【0031】

本開示は、多孔質細胞培養物品およびその物品を製造する方法と使用方法にも関する。細胞培養物品は、培養された細胞の有用な培養特性および光検出特性を有する三次元環境(3D細胞培養)を提供する。

#### 【0032】

生きている実在物中において、細胞は典型的に、細胞外基質(ECM)の支持構造により三次元で増殖する。このECMは、例えば、3Dにおける細胞増殖のための機械的支持を提供すると同時に、増殖し、その機能性を発達させながら、細胞間の連絡を可能にする、コラーゲン、エラスチンおよびラミニンなどのタンパク質を含有する。細胞生物学者、特に、癌の研究者には、長年、ペトリ皿の平らな表面上での伝統的な単層または二次元(2D)細胞培養は、細胞がその自然な生物学的活性および機能を完全に発現するのに必要な増殖環境を再現するために、十分には技術的に洗練されていないと思われてきた。in-vivo細胞増殖構造に密接に似せたそのような3D細胞培養システムにおける研究の関心は、数十年前に始まった。しかしながら、ビッセル(Bissell)等のグループが、これまで2D培養システムにおいて培養された細胞には決して観察されなかった、3D培養システムにおいて培養された乳癌細胞の反転(reversal)を示す(V. W. Weaver, et al., Journal of Cell Biology, V137 (1), p231-245, 1997を参照)まで、3D細胞培養システムに関する機運は変化しなかった。それから、3D細胞培養システムは、急激に、従来の単層細胞培養システムに取って替わるようになった。

20

30

#### 【0033】

コラーゲンゲル(H.K. Kleinman, et al., Biochemistry 21, p6188-6193, 1982参照)およびMatrigel(登録商標)(Bell, E., Ivarsson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 76, p. 1274-1278, 1979参照)などの動物組織由来の生体材料が、3D細胞培養におけるECMとして研究者により普通に使用されてきた。これらの材料は、3D細胞培養に有効であり、細胞を基質内の数百マイクロメートルの深さまで結像させられることが実証されてきたが、動物組織の抽出物は、例えば、以下のような欠点を示す：

バッチ毎の基体の制御できない未確定の組成、これにより、異なる起源からの基体の培養結果を比較するのが難しくなる；

40

基質内で形成された細胞スフェロイドのサイズが不揃いである、これは、結果を定量化するのが難しいことを表す；および

基質のゲル形式のために、培養体の物理的操作が難しくなる、例えば、細胞培養体を乱さずに、培養中に培地を交換するのが難しくなり得る。したがって、様々な合成材料に基づく細胞培養基体が、3D細胞培養のための天然基体に対する代替案として開発されてきたが、ある程度の成功しか得られていない。いくつかの例示の実例としては以下のものがある：マイクロ規模またはナノ規模のマイクロファイバからなる合成高分子が成功した細胞培養を示した(E. Entcheva, et al., Biomaterials, 25(26), P5753-5762, 2004; C.E. Semino, et al., Differentiation, 71, p262-270, 2003参照)が、細胞増殖の深さが限られ、二次元細胞培養に似ている；細胞の直径未満の細孔サイズを有する多孔質高分子材

50

料がその表面に細胞スフェロイドの形成を支援するが、ここでも、増殖深さが限られており、これはナノまたはマイクロファイバ基質に似ている；ポリ（乳酸）（PLA）およびポリ（グリコール酸）（PGA）などの合成材料により製造されたマクロ孔質基質（D. Barrera, et al., Copolymerization and degradation of poly(lactic-co-lysine), Macromolecules, 28, p425-432, 1995; G. Vunjak-Novakovic, et al., Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering, Biotechnol. Prog., 14, p. 193-202, 1998参照）は、細胞が、ファイバ系基質より深い深さまで増殖できる構造を提供する。しかしながら、これらの材料は不透明であり、共焦点蛍光顕微鏡法および二光子蛍光法などの最も進歩したイメージング技法でさえ、基体中に数百マイクロメートル以上も深くを結像できない。それゆえ、理想的な3D細胞培養システムは、三次元の細胞増殖を支援するための適切な三次元細胞外基質（ECM）または足場を提供すべきだけでなく、培養基質中の細胞をその後検出できるべきでもある。現在入手できる3D細胞培養システムは、主に、3Dでの細胞増殖を支援することに焦点を当てているが、培養された細胞のその後の検出はほとんど考慮されていない。本開示は、細胞の増殖または維持が可能であり。その上、培養された細胞の都合の良い検出、研究、またはモニタリングを与える3D細胞培養システムを提供する。

10

## 【0034】

細胞培養の限られた視認性の問題および細胞培養をモニタする上での限られた視認性の問題は、三次元（3D）に相互接続された多孔質網目構造を有し、高い光学的透明性を有する、本開示の高多孔質細胞培養組成物および物品により解決される。

20

## 【0035】

ある実施の形態において、本開示は、三次元多孔質細胞培養物品を製造する方法であって、

ジメチルシロキサンプレポリマーまたは前駆体およびシロキサンプレポリマー硬化剤、架橋剤、または同様の触媒などの、少なくとも1種類のモノマーまたはオリゴマーと、少なくとも1種類の粒状細孔形成剤とを含む混合物を重合させて、粒子相を有する連続高分子基質を形成し、

得られた固体基質を処理して、その基質から粒子相を除去する、各工程を有してなる方法を提供する。

高分子基質中の粒子相は、例えば、連続相、半連続相、不連続相、またはそれらの組合せであって差し支えない。

30

## 【0036】

ある実施の形態において、少なくとも1種類の粒状細孔形成剤は、例えば：

約75マイクロメートルから約1,000マイクロメートルまでの粒径を有する第1の粒子混合物、

約0.1マイクロメートルから約75マイクロメートルまでの粒径を有する第2の粒子混合物、または

それらの組合せ、

の内の少なくとも1つであって差し支えない。

40

## 【0037】

ある実施の形態において、細孔形成剤は、例えば、単峰性粒径分布を有する同様のまたは異なる粒子の混合物を含んで差し支えない。粒径分布特性に応じて、単峰性分布は、大きい、中間の、または小さい間隙、もしくはそれらの混合物を有する粒子相、並びにその粒子相の除去後の、対応する大きい、中間の、または小さい表面細孔、またはその混合物を提供できる。図4は、最密充填単峰性の大きい細孔形成剤集合体の例を示している。

## 【0038】

ある実施の形態において、細孔形成剤は、例えば、二峰性粒径分布を有する粒子の混合物を含んで差し支えない。各ピークを適切な量で有する二峰性粒径分布は、大きい間隙と小さな間隙の混合物、大きい表面細孔と小さい表面細孔の混合物、またはそれらの混合物を有する粒子相を提供できる。図5は、大きい細孔形成剤と小さい細孔形成剤の混合物を

50

有する最密充填の二峰性集合体の例を示している。

【 0 0 3 9 】

ある実施の形態において、第 1 の粒子混合物および第 2 の粒子混合物を有する場合、それぞれの混合物は、例えば、単峰性粒子、二峰性粒子、単分散性粒子、二分分散性粒子、多分散性粒子、およびそれらの組合せから独立して選択して差し支えない。ある実施の形態において、第 1 の粒子混合物および第 2 の粒子混合物は、同じ物質または異なる物質であるが、異なる粒径特性、粒径分布特性、またはそれらの組合せを有する物質から構成されて差し支えない。一般に、細孔形成剤の含有量が増加するにつれて、気孔率および細孔サイズは、例えば線形に、増加する。

【 0 0 4 0 】

混合物の重合は、適切な基体上で行うことができる。それに加え、またはその代わりに、混合物の重合は、例えば、様々な有用な形状に成形された形態にあり、必要に応じて、例えば、基体、容器、または同様の支持体に付着したまたは関連付けられたプリフォームとして行っても差し支えない、すなわち、少なくとも 1 種類のモノマーまたはオリゴマーと、少なくとも 1 種類の細孔形成剤粒子材料とを含む混合物を基体上で重合させて、その基体上に連続高分子基質および不連続粒子相を形成する。

【 0 0 4 1 】

少なくとも 1 種類のモノマーまたはオリゴマーを重合させる工程は、例えば、シロキサン、ビニル置換トリアルコキシシラン、アルファオレフィン、ビニルエステル、アクリレート、アクリルアミド、不飽和ケトン、モノビニリデン芳香族炭化水素、および同様の重合性モノマーまたはオリゴマー、もしくはそれらの混合物から選択された少なくとも 1 種類のモノマーまたはオリゴマーの連続高分子相を形成する工程を含む。ここに開示された物品を形成するために重合または共重合させることのできる適切なモノマーまたはオリゴマーの例としては、モノビニリデン芳香族炭化水素（例えば、スチレン、*o*-、*m*-および *p*-メチルスチレン、2, 4-ジメチルスチレン、*Ar*-エチルスチレン、*p*-ブチルスチレンなどのアルキルスチレン、および同様のモノマーまたはオリゴマー；およびアルファ-メチルスチレン、アルファ-エチルスチレン、アルファ-メチル-*p*-メチルスチレンなどのアルファ-アルキルスチレン、および同様のモノマーまたはオリゴマー；ビニルナフタレン、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；*Ar*-ハロ-モノビニリデン芳香族炭化水素（例えば、*o*-、*m*-および *p*-クロロスチレン、2, 4-ジブロモスチレン、2-メチル-4-クロロスチレン、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；アクリロニトリル、メタクリロニトリル、アルキルアクリレート（例えば、メタクリレート、ブチルアクリレート、エチルヘキシルアクリレート、および同様のモノマーまたはオリゴマー）、対応するアルキルメタクリレート、アクリルアミド（例えば、アクリルアミド、メチルアクリルアミド、*N*-ブチルアクリルアミド、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；不飽和ケトン（例えば、ビニルメチルケトン、メチルイソプロペニルケトン、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；アルファオレフィン（例えば、エチレン、プロピレン、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；ビニルエステル（例えば、酢酸ビニル、ステアリン酸ビニル、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；ビニルおよびビニリデンのハロゲン化物（例えば、ビニルおよびビニリデンの塩化物と臭化物、および同様のモノマーまたはオリゴマー）；ビニル置換トリアルコキシシラン、および同様のモノマーまたはオリゴマーなどのビニル置換シラン、またはそれらの組合せが挙げられる。細矢等は、“High-Performance Polymer-Based Monolithic Capillary Column,” *Anal. Chem.*, 2006, 78 (16), 5729-5735において、ジアミンである 4-[ (4-アミノシクロヘキシル)メチル]シクロヘキシルアミン (BACM) およびキラルトランス-1, 2-シクロヘキサジアン (CHD) と共に、エポキシモノマー、トリス (2, 3-エポキシプロピル) イソシアヌレート (TEPIC) を使用して毛管カラムを調製したと述べており；辻岡等は、“A New Preparation Method for Well-Controlled 3D Skeletal Epoxy Resin-Based Polymer Monoliths,” *Macromolecules*, 2005, 38 (24), 9901-9903において、3Dモノリスを調製するために、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADE

10

20

30

40

50

)、(BACM)、およびポリ(エチレングリコール)(PEG)などの細孔生成(porogenic)溶媒を使用したと述べている。

【0042】

少なくとも1種類の細孔形成剤は、例えば、単糖、多糖、ポリアルキレングリコール、ポリビニルアルコール、氷、ワックス、固体CO<sub>2</sub>などの昇華性材料、形成される高分子の融点より低い融点を有する物質、水溶性高分子、水不溶性高分子、またはそのコポリマー、シェルとコアを有するマイクロカプセルであって、例えば、シェルがモノマーまたはオリゴマー不溶性材料を含み、コアが水混和性または水溶性材料を含むマイクロカプセル、可溶性シェルと中空またはガス充填コアを有するマイクロバルーン、もしくはそれらの組合せであって差し支えない。

10

【0043】

得られた重合済み固体基質を処理して、その基質から粒子相を除去する工程は、例えば、

ある物質と接触させて、粒子相を溶解させる工程であって、その物質が、水溶液；有機溶液；超臨界流体、例えば、CO<sub>2</sub>；低融点固体、例えば、ワックス、水、および同様の低融点固体；ガス、例えば、空気、N<sub>2</sub>、アルゴン、および同様のガス；またはそれらの組合せ：の内の少なくとも1つを含むものである工程；

基質を加熱して、粒子相を液化または溶解させる工程；または

接触と加熱の組合せ；

を含んで差し支えない。

20

粒子相のない得られた高分子相は、例えば、1.2から1.4、1.2から1.35、1.25から1.4、1.3から1.49、1.3から1.4、1.35から1.49、1.35から1.4、および同様の値と範囲などの全ての中間値と範囲を含む、約1.2から約1.49までなどの約1.49以下の屈折率を有することができる。

【0044】

ある実施の形態において、調製方法はさらに、例えば、得られた細胞培養物品において空隙体積となる、すなわち、空隙体積と細孔体積の合計となる粒状細孔形成剤により占められる体積分および連続高分子基質となる空隙体積を有する粒径集合体に基づいて細孔形成剤充填密度を選択する工程をさらに含んでも差し支えない。少なくとも1種類のモノマーまたはオリゴマーと少なくとも1種類の粒状細孔形成剤とを含む混合物は、例えば、高速液固混合、液固ブレンド、液固遠心分離法、またはそれらの組合せ：の内の少なくとも1つによって調製することができる。

30

【0045】

ある実施の形態において、本開示は、例えば：

相互接続された多孔質網目構造を有する高分子塊であって、相互接続された多孔質網目構造が、細孔サイズの単一分布、または大きいサイズの細孔と小さいサイズの細孔並びに対応する空隙の二峰性分布からなる細孔を含むものである高分子塊を含む、三次元細胞培養物品を提供する。ある実施の形態において、その物品の高分子塊は、例えば：ビーズ；再構成可能な粉末；コーティング配合物、例えば、多孔質高分子塊の粒子の懸濁液；20マイクロメートルから500マイクロメートルの厚さの薄膜、10,000マイクロメートルから100,000マイクロメートル以上の厚さの厚膜、または500マイクロメートルから10,000マイクロメートルの厚さの中間厚の膜、もしくはそれらの組合せ：の内の少なくとも1つであって差し支えない。

40

【0046】

ある実施の形態において、本開示は、

少なくとも1種類のモノマーまたはオリゴマーと少なくとも1種類の粒状細孔形成剤とを含む混合物を重合させて、別個の粒子相を有する連続高分子基質を形成する工程、および

得られた固体基質を処理して、その基質から粒子相を除去する工程、を含む上述したプロセスにより調製された三次元細胞培養物品を提供する。

50

## 【 0 0 4 7 】

この三次元細胞培養物品は、例えば、基体；およびこの基体上に支持された相互接続された多孔質網目構造を有する高分子相であって、連続または半連続空隙相を有する連続高分子基質を含む高分子層を含んで差し支えない。ある実施の形態において、細胞培養物品は、二相が連続した材料であると特徴付けることができる、すなわち、高分子が連続基質を形成し、粒子空隙が、第2の連続した、中空または開いているかにかかわらず相を形成する。

## 【 0 0 4 8 】

ある実施の形態において、多孔質高分子物品は、例えば、約 0.1 から約 20 m<sup>2</sup> / g の表面積を有し得る。

10

## 【 0 0 4 9 】

ある実施の形態において、多孔質高分子物品は、水銀または窒素気孔率測定により測定して、中間の値と範囲を含む、例えば、約 50% から約 95% の気孔率を有し得る；多孔質高分子物品は、中間の値と範囲を含む、例えば、約 1.28 から約 1.49 の屈折率を有し得る；多孔質高分子物品は、中間の値と範囲を含む、例えば、約 1 から約 1,000 kg / m<sup>3</sup> の密度を有し得る。

## 【 0 0 5 0 】

ある実施の形態において、ポリジメチルシロキサン多孔質高分子の屈折率は、例えば、約 1.28 から約 1.49 であって差し支えなく、典型的な水性細胞培養培地の屈折率は、例えば、約 1.33 から約 1.36 であり得る。多孔質高分子の屈折率および典型的な水性細胞培養培地の屈折率は、それぞれの屈折率が一致するまたはほぼ一致する、例えば、それぞれの屈折率の差が約 ± 0.2 単位未満、好ましくは約 ± 0.15 未満、より好ましくは約 ± 0.12 未満、さらにより好ましくは約 ± 0.10 未満となるように選択することができる。多孔質高分子物品は、例えば、約 0 から約 1 の光学密度、および例えば、約 100 から約 1,000 マイクロメートル以上の光侵入深さを有し得る。多孔質高分子物品は、約 500 から約 500,000 ダルトンの分子量を有する、ポリマー、コポリマー、または同様の材料を含み得る。

20

## 【 0 0 5 1 】

ある実施の形態において、その物品は、さらに、栄養素、抗生物質、成長促進剤、成長阻害剤、表面修飾剤、表面相溶化剤、および1種類以上の促進剤、阻害剤、調節剤、調整剤、誘発因子、またはそれらの組合せなどの同様の細胞培養成分からなる群より選択される添加剤を少なくとも1つ含み得る。

30

## 【 0 0 5 2 】

ある実施の形態において、本開示は、例えば、上述した細胞培養を、基体と、この基体上に支持された相互接続された多孔質網目構造を有する高分子層とを含む物品と接触させる工程であって、多孔質高分子層が、連続または半連続空隙相を有する連続高分子基質を含むものである工程、および温度制御、培地交換、および生きている細胞などの適切な培地と培養条件；を含む細胞培養方法を提供する。

## 【 0 0 5 3 】

この細胞培養は、業界基準のコラーゲン表面の保持率と比べて約 70 から約 100 パーセントの保持率を提供する。

40

## 【 0 0 5 4 】

ある実施の形態において、適切な細胞株の一例として、ヒト初代細胞が挙げられる。ある実施の形態において、培養物品は、優れた細胞株性能、細胞機能性、細胞生存能力、細胞遺伝子発現、および同様の特性、またはそれらの組合せを提供する。

## 【 0 0 5 5 】

細胞培養と細胞検出を促進できる3D細胞培養基体を開発するために、基礎材料の光学的性質を、培養される細胞をその後モニタするために使用される所望の検出またはイメージング技法に適合させることが望ましい。本開示の実施の形態において、蛍光顕微鏡を使用して、培養物中の細胞をモニタするために使用することができる。開示された細胞培養

50

物を構成するための基礎材料の以下の光学的性質を考慮すべきである：光検出中の培養物からの光の干渉を避けるために、動作波長範囲における良好な光学的透明性；および検出中の材料からの光散乱を減少するために培地の屈折率と密接に一致した屈折率。その物品の多孔質材料の光学的性質に加え、この多孔質材料の化学的性質は、細胞の増殖が、培養プロセス中にその物品の変化に曝されないように、培養条件下で非常に安定であるように選択することができる。ある実施の形態において、多孔質材料は、細胞増殖を促進するために、良好なガス透過率および水浸透率を有することが好ましい。

**【0056】**

ある実施の形態において、基礎高分子材料を、例えば、強制充填および浸出プロセスにより、相互接続された細孔または間隙を有する高多孔質構造に形成することができる。強制充填プロセスにおいて、所望のサイズの充填剤または細孔形成剤が基礎高分子材料と均質に混合され、重力または圧力いずれかを使用して、充填剤を互いに緊密に接触させ、モノマーまたはオリゴマー、プレポリマー、または得られる重合済みまたは硬化済み基礎高分子材料の前駆体と密接に充填される。充填剤を除去するために、適切な選択された溶媒を含む超音波浴内で浸出または溶解することなどにより、充填剤が充填された得られた基礎高分子材料を処理することができる。多孔質基体の細孔径分布は、充填剤のサイズにより調節することができ、その充填剤は、所望の培養用途に応じて、一サイズ分布または複数のサイズの分布であって差し支えない。サイズの検討に加え、使用する充填剤は、多孔質基体中に残る任意の残留する未浸出充填剤が細胞増殖に悪影響を与えないように、細胞培養の生理学的条件に対する毒性または干渉性が最小であるべきである。

10

20

**【0057】**

所望の粒径およびサイズの分布の細孔形成剤は、例えば、粒径減少法、粒径成長法、またはそれらの組合せを含む任意の適切な方法によって得て差し支えない。乾燥固体粒子またはキャリア流体中に懸濁された粒子に、粒径減少装置を使用することができる。高压液体流を使用した一液型粒径減少装置は、例えば、「PARTICLE-SIZE REDUCTION APPARATUS, AND USE THEREOF」と題する国際公開第2006/064203号パンフレットに述べられたような増圧器の改良が施されたMicrofluidizer（登録商標）、または同様の装置であり、もしくは同様のサイズ処理装置を使用して、サイズの減少によって所望の粒子を製造しても差し支えない。

**【0058】**

粒径成長方法の例としては、エマルションまたは懸濁液重合プロセス、または同様の粒径成長方法が挙げられる。サイズ減少粒子またはサイズ増加粒子は、例えば、粗粒分離器、フィルタ、スクリーン、または同様の装置によって、粒径または直径の範囲にしたがって、分離して差し支えない。

30

**【0059】**

所望の粒径および粒径分布は、例えば、レーザ回折、動的光散乱、画像分析、または同様のサイズ処理装置および方法を含む、ホリバ社（www.boriba.com）から入手できるもののような、任意の適切な粒子分析装置によって測定し、特徴付けることができる。ホリバルB-550は、ppmから約40%の固形物までの濃度範囲で、1mmから約6マイクロメートルの粒径を測定することができる。ホリバルA-300レーザ回折粒径分布分析器を使用して、懸濁液または乾燥粉末の粒径を測定して差し支えない。

40

**【0060】**

培養物品の製造、および基体や包装材料などの付随する部材の入手は、滅菌状態で行えることが好ましい。

**【0061】**

ある実施の形態において、本開示は、非動物源の細胞培養コーティングおよびin-vivo様細胞培養を提供するその対応する被覆基体を提供する。

**【0062】**

ある実施の形態において、開示された多孔質コーティングおよび物品は、容易に調製することができる、比較的安価である。開示されたコーティングは、非動物由来の基体コーテ

50

ィングを提供し、得られた被覆製品は、例えば、ロット間の変動がほとんどまたは全くなく、優れた貯蔵安定性および棚 - および生物学的 - 安定性を有する。実施の形態において、開示された多孔質高分子コーティングは、例えば、高分子コーティング中に使用されるモノマーまたはオリゴマーの選択により、容易に調節できる屈折率を有する基体表面コーティングを提供できる。開示されたコーティング組成物は、非毒性であり、生体適合性であり得る基体表面コーティングを提供できる。開示されたコーティング組成物は、様々な表面上に堆積させるのが容易などの、加工性の高い基体表面コーティングを提供し、様々な基体、例えば、プラスチック、ガラス、および同様の細胞培養基体または支持体への細胞とコーティングの付着を向上させる。所望であれば、アミノシランなどの結合層または転化コーティングを選択して、多孔質高分子のガラスなどの基体に対する付着性を向上させても差し支えない。

10

**【0063】**

ある実施の形態において、本開示は、細胞培養の方法であって、  
上述した多孔質組成物または同様の組成物により被覆された基体を提供し、  
被覆された基体を、機能的細胞を固定するのに十分な時間に亘り細胞培養物と接触させ

、  
その細胞を光学的方法によってモニタし、  
必要に応じて、基体から細胞を収穫する、  
各工程を有してなる方法を提供する。

**【0064】**

ある実施の形態において、基体は、例えば、金属酸化物、複合金属酸化物、合成高分子、天然高分子、同様の材料、またはそれらの組合せから選択される材料であって差し支えない。ある実施の形態において、本開示の多孔質細胞培養物品は、例えば、生体適合性がより優れた物品を得るために、表面処理または状態調節によって、さらに処理して差し支えない。例えば、同一出願人の米国特許第6617152号および同時係属の米国特許出願第11/973832号の各明細書を参照のこと。

20

**【0065】**

細胞培養物の細胞は、例えば、肝細胞などの任意の細胞タイプの、任意の適切な初代細胞、または関連する無限に再生産された細胞株であって差し支えない。細胞培養物は、例えば、アルブミンを盛んに産生する細胞、基体、または同様の実在物、およびそれらの組合せを含んでよい。基体からの細胞の収穫は、例えば、遠心分離、攪拌、洗浄、および同様のプロセス、またはそれらの組合せを含む、任意の適切な手段によって行っても差し支えない。

30

**【0066】**

ある実施の形態において、多孔質組成物の調製に使用するのに、様々な生体適合性高分子材料を選択して差し支えない。それに加え、またはそれに代わり、生体適合性高分子材料は、単独で、もしくは他の細胞培養材料または支持材料と組み合わせてまたは混合して使用して差し支えない。その高分子材料の例としては、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリハロゲン化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、およびそのコポリマー、ニトロセルロース、アクリルエステルとメタクリルエステルのポリマー、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、硫酸セルロースナトリウム塩、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(エチルメタクリレート)、ポリ(ブチルメタクリレート)、ポリ(イソブチルメタクリレート)、ポリ(ヘキシルメタクリレート)、ポリ(イソデシルメタクリレート)、ポリ(ラウリルメタクリレート)、ポリ(フェニルメタクリレート)、ポリ(メタクリレート)、ポリ(イソプロピルアクリレート)、ポリ(イソブチルアクリレート)、ポリ(オクタデシルアク

40

50

リレート)、ポリエチレンポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(酢酸ビニル)、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルテン、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギネート、キトサン、およびそれらの任意のコポリマー、またはそれらの任意の組合せが挙げられる。

【0067】

細胞の生理的機能は、細胞培養環境によって大きく影響を受け得る。細胞を、その細胞の特定の機能を最良に維持できる系内で培養することが有益であり得る。平らな表面上の従来の二次元(2D)細胞培養と比べると、「Matrigel」などの様々な基質中の三次元(3D)細胞培養には、in-vivo細胞環境を厳密に模倣しているため、細胞機能を維持する上で実証された明らかな有用性がある。細孔径および基質剛性が、3D細胞培養システムにおける細胞形態学および機能を調節する2つの重要な要因と認識されてきた(例えば、C.S. Ranucci, et al., Biomaterials 21(2000) 783-793; M.H. Zaman, et al., Proc Natl Acad Sci USA 103(29) 2006, 10889-94; T. Sun, et al., "Investigation of fibroblast and keratinocyte cell-scaffold interactions using a novel 3D cell culture system", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18 (2), 2007, pp. 321-328を参照のこと)。しかしながら、これらの培養システムにおける細孔径の精密な制御および調節は、困難であり得る。

10

【0068】

ある実施の形態において、本開示は、特定の細胞の細胞機能を調節するために、3D細胞培養基体の細孔径および剛性を制御し、調節するための組成物および方法を提供する。

20

【0069】

ある実施の形態において、本開示は、3D細胞培養において細胞機能を調節できる多孔質合成材料基体を製造するための設計および方法を提供する。生きている実在物の外部で細胞が増殖し、生物学的機能を果たすためのin-vivo様環境を提供することに加え、細胞機能を調節するために、これらの多孔質基体の細孔径および剛性を制御し、調節しても差し支えなく、この細胞機能は、汎用の細胞に基づく用途の様々な必要性を果たすことができる。例えば、ある薬剤の誘導試験には、標的遺伝子の比較的低い基底発現レベルしか必要ないのに対し、薬剤の阻害試験には、標的遺伝子の比較的高い基底発現レベルが必要である。基体の細孔径および剛性の特性を調節することによって、遺伝子発現レベルを調節する能力は、他の培養条件への乱れを最小にしながら、これらの結果を比較するための有用なプラットフォームを提供する。

30

【0070】

ある実施の形態において、本開示は、異なる細胞株に関して最適化された培養性能を提供するように調節できる、多孔質足場の細孔径および剛性などの性質を有する材料、および細胞の増殖および形態学を調節できる多孔質足場の細孔径および剛性を制御する方法を提供し、その足場は、遺伝子発現レベルで細胞機能を選択的に調節することができる。

【0071】

開示された多孔質高分子基体は、3D細胞培養に関する以下の特徴を提供できる：

細孔径制御 細孔径は、容易に制御し、調節することができ、これは、細胞と細胞の相互作用および組織化のよく制御された物理的調節を提供する。

40

【0072】

細胞の順序付け(ordering) 細胞培養中の細胞の組織化と相互作用は、細胞の増殖と細胞の機能発現に影響を与え、したがって、細胞機能は、細孔径を調節することによって調節できる。

【0073】

細胞の調節 細孔径制御による細胞機能の調節は、細胞の生理的環境の乱れを最小にする。同じ供給源からの細胞は、異なる基体の細孔径特性によって機能的に調節でき、比較のためのモデルを提供する。例えば、より小さな細孔を有する開示された多孔質PDMS基体において培養されたヒト肝細胞は、CYP1A2、CYP2B6、およびCYP3

50

A4などの、CYP(シトクロムP450)の中程度のレベルを示したが、リファンピン(USAN)またはリファンピシン(INN)により誘発された上昇した薬剤応答を示し、このことは、薬剤候補による細胞機能の誘導研究にうまく適している。より大きい細孔を有する多孔質PDMSにおいて培養されたヒト肝細胞は、上昇したレベルのCYP遺伝子を有することが示され、この状況は、薬剤候補による細胞機能の阻害研究にとって理想的である。

【0074】

基体の調節および遺伝子の調節 開示された多孔質基体について、例えば、ヤング率として測定された剛性を正確に制御し、調節することができる。開示された基体の細孔径および剛性の容易な調節により、適合性が高く、汎用の3D細胞培養プラットフォームが提供される。ヤング率は、高分子材料の剛性の尺度の1つである。ヤング率が高いほど、材料が硬くなる。このことは、材料のサンプルに行った引張試験中に生じた応力-歪み曲線の勾配から実験的に決定できる。応力-歪み曲線は、破損(例えば、破壊)するまで、材料に印加した力(応力)の関数として材料の伸張(歪み)をプロットしている;図13参照のこと。勾配が急な場合、そのサンプルは高い縦弾性係数を有し、このことは、材料が変形に抵抗し、高い剛性を有することを意味する。勾配が穏やかな場合、その材料は低い縦弾性率を有し、このことは、その材料が容易に変形され、低い剛性を有することを意味する。係数は、Pa、またはN/cm<sup>2</sup>などの強さの単位で表すことができる。生きている細胞の遺伝子発現のレベルは、多孔質高分子層のヤング率の剛性と共に増加することが示された。ある実施の形態において、多孔質高分子層は、例えば、中間の値と範囲を含む、約0.1MPaから約15MPaのヤング率を有し得る。

10

20

【0075】

細胞機能は、細胞培養環境によって大きく影響を受け得る。うまく設計された細胞培養システムにおいて、細胞は特定の細胞機能を維持できる。その上、細胞機能は、その物理的相互作用を培養環境で調節することによって、調節することができる。

【0076】

ある実施の形態において、本開示は、多孔質培養基体の細孔径および係数(剛性)を調節することによって、3D細胞培養における細胞機能を調節する方法を提供する。

【0077】

ある実施の形態において、主細孔群の細孔径は、単細胞よりも大きくて差し支えない。したがって、細胞は、細孔の内部に播種し、移行し、増殖し、組織化する傾向にある。基体の細孔径分布は、細胞と細胞のおよび細胞と基質の相互作用への物理的制約として細胞機能に著しく影響を与え得る。開示された多孔質PDMSは、細胞が細孔内に成長することができ、細胞と細胞の相互作用を促進する微小多孔質構造を有する。基体の細孔径の関数としての初代ヒト肝細胞のスフェロイド形成の画像を得た(カラー画像は示されていない)。それらの画像は、多孔質PDMS細孔径範囲は、180~212マイクロメートルから、300~355マイクロメートルまで増加するにつれて、1つのスフェロイドが個々の細孔内に形成される傾向にあり、スフェロイドのサイズが、細孔径の増加と共に増加し、次いで、500~600マイクロメートル、850~1,000マイクロメートル、そして1,000~1,400マイクロメートルへと増加すると、個々の細孔中により大きいスフェロイドを形成する代わりに、多数のより小さいスフェロイドが形成されることを示している。1,000マイクロメートルより大きいサイズの細孔の基体内では、より小さいスフェロイドが形成が形成され、細胞は、細胞と細胞の粘着が緩い凝集体を形成する傾向にある。

30

40

【0078】

様々な細孔径を有する(棒グラフは示されていない)開示された多孔質PDMS内で培養されたヒト肝細胞における、コラーゲンおよび「Magrignel」対照に対する、遺伝子ABCB1(ATP-結合カセット、サブファミリーB(MDR/TAP)、メンバー1)、ACCC2(ATP-結合カセット、サブファミリーC(CFTR/MRP)、メンバー2)、ALB(アルブミン)、CEBPA(CCAAT/エンハンサー結合タン

50

パク質 (C/EBP)、アルファ)、GJB1 (ギャップ結合タンパク質、ベータ1)、HNF4A (肝細胞核因子4、アルファ)、およびUGT1 (UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ1)の基礎的遺伝子発現の実験は、一貫して、10種類の遺伝子マーカーの全てが、リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (RQ-PCR)により明確に発現されることを示した。これらの遺伝子は、肝細胞の機能が、業界基準のコラーゲン表面および「Matrigel」と比べて、この基体内でどれだけよく保存されているかを測定するための一連のマーカーである。コラーゲン表面と比べて10種類のマーカーの全ての高い発現が、多孔質PDMSがコラーゲンよりもよく肝細胞の機能を保存できることを示している。より重要なことには、これらの遺伝子の発現レベルが、肝細胞機能を保存するための優れた市販の基体の1つである「Matrigel」に匹敵する。図面において、y軸の「RQ」は、ハウスキーピング遺伝子ヒポキサンチンデアミノホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (HPRT1)の発現レベルによって割られた特定の遺伝子マーカーの遺伝子発現レベルの「相対的定量化」を表す。

10

#### 【実施例】

#### 【0079】

以下の実施例は、本開示を使用する様式をより完全に記載し、さらに、本開示の様々な態様を実施するために考えられる最良の態様の特定の実施例を図示し実証するように働く。これらの実施例は、本開示の範囲を制限するものではなく、むしろ、説明目的のために提示されたものである。

20

#### 【0080】

マルチウェルプレート形式で細胞培養基体を製造する方法

各々が本発明の多孔質PDMSを有する多数のユニットが、以下に記載されるように標準的な穴あきプレートのマルチウェルアセンブリのガラスインサート上に直接形成することができる。

#### 【0081】

a. マルチウェル穴あきプレートなどの支持基体上への多孔質高分子ユニットの直接形成

選択されたモノマーまたはオリゴマー、随意的な架橋剤、および例えば、1つ、2つまたは多数の粒径分布を有する細孔形成粒子を均一に混合物に混合する。

30

#### 【0082】

例えば、遠心、振盪、加圧、または同様の方法によって、細孔形成剤を適切に充填する。

#### 【0083】

約500マイクロメートル未満の厚さのガラス板などの支持基体の上面に、マルチウェル穴あきプレートなどの所望のマルチユニット形式の成型型を配置する。

#### 【0084】

細孔形成剤が充填されたモノマーまたはオリゴマーの均一な混合物を成型型の空間内に注ぎ入れる。

#### 【0085】

規定の硬化条件で成型型内の均一な混合物を硬化させる。

40

#### 【0086】

成型型から硬化した混合物を物理的に取り外す。

#### 【0087】

硬化した混合物から細孔形成剤を除去する。

#### 【0088】

適切な接着剤または物理的保持部材などによって、支持基体を穴あきプレートに取り付ける。

#### 【0089】

b. マルチウェルプレートの底部への多孔質高分子の直接形成

選択されたモノマーまたはオリゴマーおよび架橋剤の混合物をマルチウェルプレートの

50

各ウェル中に分配する。

【0090】

細孔形成剤を各ウェル中に分配し、約30分間に亘りプレートを振盪する。

【0091】

さらに30分間の振盪後に細孔形成剤の層が、モノマーまたはオリゴマーおよび細孔形成剤の混合物の表面上に残留するまたは留まるときなどの、モノマーまたはオリゴマーの混合物が細孔形成剤で飽和されるまで、各ウェル中に細孔形成剤を分配し続け、振盪する。

【0092】

規定の硬化条件で高分子および細孔形成剤の混合物を硬化させる。

10

【0093】

硬化後、適切な浸出条件を使用して細孔形成剤を除去する。

【0094】

c. 多孔質高分子を予備成形し、次いで、それらをマルチウェルプレートの各ウェル内に分配する

選択されたモノマーまたはオリゴマー、架橋剤、および1つまたは2つの粒径分布（すなわち、単峰性または二峰性）を有する細孔形成剤を容器内で混合する。

【0095】

細孔形成剤および高分子前駆体を充填する。

【0096】

混合物を硬化させて、高分子を架橋させる。

20

【0097】

硬化した高分子から細孔形成剤を浸出させる。

【0098】

得られた多孔質高分子を所望の形状とサイズに切断し、その切片をウェルプレートの底部に配置する。

【0099】

不活性接着剤などの固定手段を施して、多孔質高分子サンプルをプレートの底部に固定する。

【0100】

多孔質高分子（PDMS）における肝細胞培養の評価

30

多孔質高分子における肝細胞の細胞株C3Aの付着または生死判別研究 細胞溶解の際に、安定な細胞質型酵素である乳酸脱水素酵素（LDH）が放出される。放出されたLDHの量は、溶解した細胞の数に比例する。生存細胞数を定量することによって、多孔質高分子基質内のC3A細胞の付着を評価するために、Cytotoxicity 96細胞毒性アッセイキット（プロメガ社(Promega)）を使用した。コラーゲン培養プレートおよび「Matrigel」3D培養体を対照基準として使用した。

【0101】

図6は、多孔質PDMS高分子基質上の肝細胞の細胞株C3Aの24時間の培養後のLDHアッセイに関する細胞付着評価の結果を示している。7日間の培養後のLDHアッセイについて同様の結果が観察され、図7に示されている。LDHアッセイの結果に基づいて、肝細胞3A4細胞株は、開示の多孔質高分子基体中で培養でき、細胞の付着はコラーゲンの基準に匹敵すると容易に結論付けられる。

40

【0102】

初代ヒト肝細胞の付着または生死判別研究

図8は、誘導因子のある場合と無い場合の比較のコラーゲンと本発明の多孔質高分子（PDMS）における初代ヒト肝細胞培養のLDHアッセイの結果を示している。誘導因子は、10マイクロモルの最終濃度のリファンピンであった。

【0103】

正規化基準としてのコラーゲンを使用した多孔質PDMS内で培養された初代ヒト肝細胞

50

### の遺伝子発現分析

機能的に安定な初代ヒト肝細胞の長期培養の維持が、薬剤発見のための薬剤代謝研究における主要な目的である。様々な遺伝子マーカーの遺伝子発現は、対応する細胞機能を評価するための信頼性のある方式である。開示された分析において、mRNAレベルで遺伝子発現を特定するために、リアルタイム定量的PCRを使用した。表1に列記された10種類の遺伝子マーカーを、肝細胞特異的機能におけるそれらの役割に基づいて選択した。

【表1】

表1.

遺伝子	遺伝子機能
ABCB1 (900)	トランスポーター
ABCB2 (905)	トランスポーター
ALB (910)	アルブミンタンパク質
CEBPA (915)	転写調節因子
CYP1A2 (920)	代謝第一相
CYP2B6 (925)	代謝第一相
CYP3A4 (930)	代謝第一相
GJB1 (935)	信号伝達
HNF4a (940)	転写調節因子
UGT1 (945)	代謝第二相

10

20

30

#### 【0104】

図9は、正規化基準としてのコラーゲンに対する開示された組成物における初代ヒト肝細胞の遺伝子発現レベルの結果を示している。図9の結果は、本発明の多孔質PDMS内で培養された初代ヒト肝細胞は、発現のlog10(相対量)として測定された肝細胞を発現させるために使用した10種類の遺伝子マーカー全てを発現した：ABCB1(900)、ABCB2(905)、ALB(910)、CEBPA(915)、1A2(920)、2B6(925)、3A4(930)、GJB1(935)、HNF4a(940)、およびUGT1(945)。

#### 【0105】

##### 実施例1

**培地調製** 開示の培地を製造し使用する態様を実証するために、基礎材料としてポリジメチルシロキサン(PDMS)を使用した。ダウ・コーニング社(Dow-Corning)からのSylgard-182 PDMSエラストマーキットを使用して、PDMS関連材料を調製した。9:1の質量比のSylgard-182A/Sylgard-182B混合物を、所望のサイズ分布の1:3またはわずかに高い体積比で砂糖の結晶と混合した。様々なサイズの篩により市販の顆粒状砂糖(ショ糖)を篩い分けすることによって、所望のサイズ分布を有する砂糖結晶を得て、次いで、2,400rpmで1時間に亘り遠心分離機内に配置して、PDMSプレポリマー内に砂糖結晶を緻密に充填し、次いで、約3時間に亘り75℃で硬化する前に、真空中で脱気した。約40から約70℃の温度で約8時間

40

50

に亘り加熱超音波浴内に脱イオン水を使用して、硬化したP D M S高分子基質から砂糖結晶を浸出させた。浸出された基質を脱イオン水で洗浄し、次いで、約24時間に亘り滅菌環境において真空下で乾燥させた。得られた多孔質P D M S材料を顕微鏡で調査し、相互接続された細孔構造および高い光学的透明性を有することが分かった。多孔質P D M S材料を、例えば、ハサミ、レーザ、パンチ、および同様の装置と方法で、細胞培養目的に望ましいサイズと厚さに容易に切断した。

#### 【0106】

光学画像分析 図面を参照すると、図1は、反射型共焦点顕微鏡によって結像した、相互接続された細孔構造を有する例示の多孔質P D M S物品を示している。

#### 【0107】

図2Aは、本発明の多孔質P D M S基体における肝細胞のスフェロイドの形成を強調している。拡大した(20X)表面画像は、多孔質P D M S上の直径約150から約180マイクロメートルの細孔の開口(左上に焦点が合っている)およびいくつかの散らばった単独の肝細胞を示している。培養したHepG2スフェロイドが表面の下と物品の間隙内(焦点が合っていない)に形成された。

#### 【0108】

図2Bは、焦点が合ったHepG2スフェロイドを強調するために、物品の表面から物品の内部に拡大(20X)焦点が移された図2Aの多孔質P D M S細胞培養物品内の培養中に形成されたHepG2スフェロイドを示している。

#### 【0109】

#### 比較例1

ポリビニルアルコール(PVA)基体 市販の多孔質PVA基体を使用したことを除いて、実施例1を繰り返した。高気孔率PVAスポンジなどの多孔質PVA基体は、例えば、セイバテック(Ceibatech)(www.ceibatech.com)から市販されており、米国特許第5554659号明細書に開示されている。多孔質PVA基体の二光子蛍光顕微鏡は、たった約90マイクロメートルの侵入しか提供しなかった。

#### 【0110】

#### 実施例2

HepG2細胞培養 生存している肝細胞C3A細胞株(10回以下の継代の)の細胞を、市販のコラーゲンおよび「Matrigel」予備被覆表面である対照と共に、多孔質P D M S表面上で、10%のFBSおよび1%のペニシリンを含むDMEM培地内で平板培養した。播種密度はウェル当たり約100K細胞であった。培養物は付着のために37で24時間に亘りインキュベートした。培地は、24時間後、三日目および七日目に交換した。実施例1の多孔質P D M S被覆基体は、3Dでの肝細胞スフェロイド培養に有用であることが示された。

#### 【0111】

図3Aは、反射型共焦点顕微鏡により結像され、実施例1にしたがって調製された、相互接続された多孔質構造を有する多孔質P D M S物品の例示のサンプルを示している。

#### 【0112】

図3Bは、530マイクロメートルの深さでの「Qdot」でドープ処理された図3Aのサンプルの二光子蛍光画像を示している。このサンプルと画像は、本開示の多孔質P D M S基体により提示される向上したイメージング侵入深さを示している。460nmの発光を有する「Qdot」蛍光ナノクリスタル(インヴィトロゲン社(Invitrogen)から得られる;www.invitrogen.com参照)が5マイクログラム/mLドープされた多孔質P D M Sサンプルを結像するために、二光子蛍光顕微鏡を使用し、図3Bに示されるように、基体内で530マイクロメートルの深さで良好な光信号が検出された。

#### 【0113】

図3Aは、多孔質P D M S基体の表面上の細孔の開口(焦点が合っている)および表面の下、すなわち、基体内に形成された肝細胞スフェロイド(焦点が合っていない)を示している。図3Bにおいて、焦点は、スフェロイドに焦点を合わせるために、基体の表面か

10

20

30

40

50

ら基体の内部へと下に移された。図3 Aおよび3 Bの画像は、HepG2細胞は、PDMS基体の相互接続された多孔質構造内に播種し、移行し、HepG2のin-vivo挙動を再現する細胞スフェロイドに形成できることを示した。

【0114】

#### 実施例3

初代肝細胞培養 キセノ・テック社(XenoTech, LLC)から購入した低温保存した初代肝細胞を解凍し、Percoll単離キット(キセノ・テック社)を使用して精製した。生存している細胞を、コラーゲンおよび「Matrigel」予備被覆表面である対照と共に、多孔質PDMS表面上で、10%のFBSを含むDFE培地(コーニング社)内で平板培養した。播種密度はウェル当たり約400K細胞であった。培養物は付着のために37で18時間に亘りインキュベートした。培地を、培養の残りの期間に亘り無血清MFE培地に変えた。CYP3A4代謝活性のためのリファンピン誘導を、培地を毎日交換しながら、3日間連続して行った。各表面培養におけるCYP3A4代謝活性は、テストステロン(200マイクロモル)と共に3時間に亘り培養した後にHPLC法により評価するか、またはPromegaP450(商標)キットを使用して測定した。培養物中の細胞数は、PromegaCytotox96非放射性細胞毒性LDHアッセイキットを使用して推測した。

10

【0115】

図10は、様々な培養表面:コラーゲン(2D)(1010)、「Matrigel」(3D)(1020)、単層PDMS(2D)(1030)、および本開示の多孔質PDMS(3D)(1040)による7日間の培養後、光学密度により測定した、生存している肝細胞の数を比較している。本開示の多孔質PDMS(3D)(1040)は、コラーゲン(2D)(1010)および「Matrigel」(3D)(1020)に匹敵し、単層PDMS(2D)(1030)と比べて並外れて良かった。

20

【0116】

#### 実施例4

細孔径が、細胞構築およびRNA発現における肝細胞の細胞機能を調節できることを実証するために、180マイクロメートルから1,400マイクロメートルに及ぶ細孔径の多孔質PDMS基体を本開示にしたがって製造した。10対1の混合比のPDMSプレポリマーと硬化剤の混合物を、約75マイクロメートルから約1,400マイクロメートルなどの明確なサイズ分布範囲を有する砂糖結晶と共に緊密に充填し、次いで、約1時間に亘り100で硬化させた。硬化時間を延ばしてよければ、より低い硬化温度を使用しても差し支えない。硬化した高分子中の砂糖を水で溶かし、超音波浴中で洗い流して、3D細胞培養のための多孔質PDMS基体を形成した。

30

【0117】

初代ヒト肝細胞を播種し、これらの細孔径が管理された多孔質PDMS基体内で培養した。肝細胞形態学の経時的研究により、多孔質基体の細孔径により、培養物中の肝細胞スフェロイドの形成が調節されたことが判明した。より小さい細孔径を有する多孔質基体において、肝細胞は、各個々の細孔内で1つのスフェロイドを形成する傾向にあり、そのスフェロイドのサイズは、細孔のサイズと共に増加した。約355マイクロメートルより大きい細孔において、大きいスフェロイドを形成する代わりに、より小さい多数のスフェロイドが各細孔内に形成する傾向にあった。多孔質基体内のスフェロイドの形成を調節することに加え、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の結果(図11)により、遺伝子CYP2B6および遺伝子CYP3A4の遺伝子発現レベルは、スフェロイドの傾向を反映した、すなわち、両方の遺伝子の遺伝子発現レベルは、基体の細孔径が180マイクロメートルから355マイクロメートルに増加したときに、減少したことが判明した。細孔径が355より大きいときに、遺伝子発現レベルは細孔径と共に増加した。さらに、リファンピンによる遺伝子発現の誘導の倍率は、180マイクロメートルから1,400マイクロメートルに変化するにつれて減少した。図11 Aおよび11 Bは、様々な細孔径を有する多孔質PDMS基体内でリファンピンにより誘導されたヒト肝細胞の遺伝子発現

40

50

レベルを示している。図 1 1 A は遺伝子 C Y P 2 B 6 の遺伝子発現を示しており、図 1 1 B は遺伝子 C Y P 3 A 4 の遺伝子発現を示しており、ここで、曲線 ( 1 1 1 0 )、( 1 1 2 0 ) および ( 1 1 3 0 ) は、それぞれ、基線、誘導、倍率誘導を表している。

【 0 1 1 8 】

少なくとも先の結果から、以下が結論付けられる：1) 多孔質 3 D 細胞培養基体の細孔径は、他の遺伝子の発現レベルを維持しながら、選択した遺伝子の発現レベルを調節することができる；2) 基体の細孔径は、誘導倍率における差（すなわち、基線発現レベル（誘導因子のない）で割った誘導因子（薬剤）による遺伝子発現レベル）を反映して、薬剤に対する細胞応答を調節することもできる；3) 約 3 5 5 マイクロメートルより小さい細孔径を有する多孔質基体は薬剤に対して高い誘導応答を促進し、これは、細胞への様々な化学物質により誘導用途に使用できる；および 4) 約 3 5 5 マイクロメートルより大きい細孔径を有する多孔質基体は、選択した遺伝子の増加した遺伝子発現を促進し、これは、細胞と薬剤の相互作用の阻害アッセイに効果的に使用できる。

10

【 0 1 1 9 】

#### 実施例 5

多孔質基体の剛性（係数）を調節することによる細胞機能の調節 P D M S の剛性率は調製条件により変動するが、典型的に、1 0 0 k P a から 3 M P a の範囲にある。P D M S の剛性（係数）は、プレポリマーおよび硬化剤の混合比と共に減少する。5 , 1 0 , 2 0 および 3 0 質量パーセントの混合比のプレポリマーおよび硬化剤の混合比を使用して、実施例 4 の手法にしたがって多孔質 P D M S 基体を製造した。初代ヒト肝細胞を播種し、7 日間 24 時間培養した。図 1 2 は、約 1 8 0 マイクロメートルから約 2 1 2 マイクロメートルの細孔径を有し、プレポリマーと硬化剤の混合比に基づく様々な剛性を有する、多孔質 P D M S 内で培養されたヒト肝細胞の遺伝子発現を示している：C Y P 1 A 2 ( 1 2 2 0 )、C Y P 2 B 6 ( 1 2 1 0 )、および C Y P 3 A 4 ( 1 2 3 0 )。P D M S の剛性は、硬化剤に対する P D M S プレポリマーの基準の混合比の増加と共に減少する。評価され、図 1 2 に示された、混合比により特徴付けられる基体の剛性は、例えば、5 : 1、1 0 : 1、2 0 : 1、および 3 0 : 1 であった。図 1 2 における細胞のリアルタイム P C R の結果は、C Y P 2 B 6 および C Y P 3 A 4 の遺伝子発現レベルが、硬化剤に対する P D M S プレポリマーの混合比の増加と共に減少する、すなわち、遺伝子発現レベルは多孔質基体の合成と共に増加することを示した。

20

30

【 0 1 2 0 】

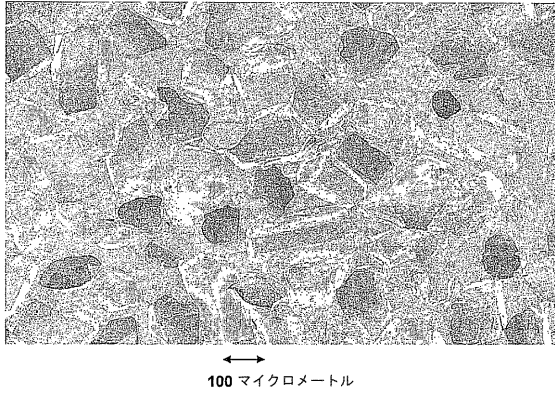
図 1 3 は、硬化剤に対するプレポリマー（モノマーまたはオリゴマー）の様々な混合比を有する、調製された多孔質 P D M S に関する測定した係数（応力対歪み）の関係を示している：5 : 1 ( 1 3 1 0 )、1 0 : 1 ( 1 3 2 0 )、2 0 : 1 ( 1 3 3 0 )、および 3 0 : 1 ( 1 3 4 0 )。図 1 4 は、混合比の関数としての図 1 3 の多孔質 P D M S 基体に関する曲線の測定した係数の関係を示している。

【 0 1 2 1 】

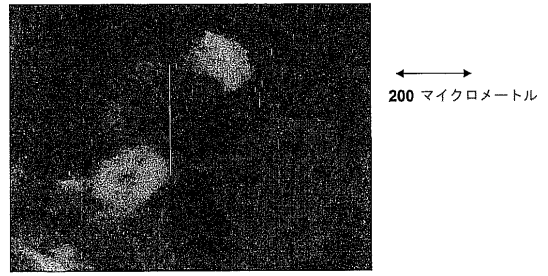
本開示は、様々な特定の実施の形態および技法を参照して説明されてきた。しかしながら、多くの変更および改変が、本開示の精神と範囲に含まれながら、可能であることが理解されよう。

40

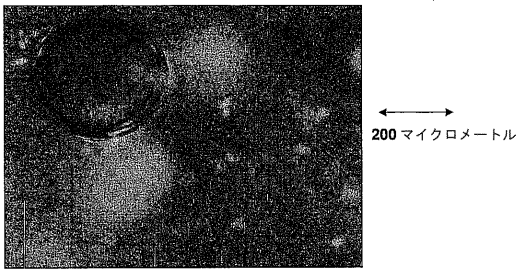
【 図 1 】



【 図 2 B 】



【 図 2 A 】



【 図 3 A 】

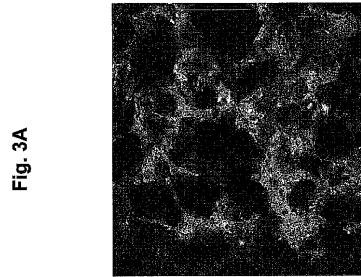


Fig. 3A

【 図 3 B 】

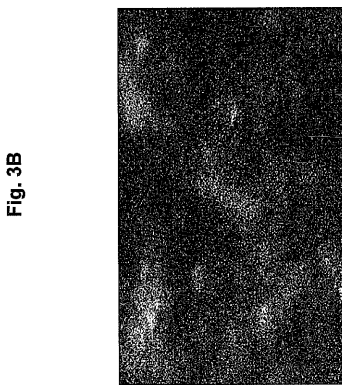


Fig. 3B

【 図 5 】

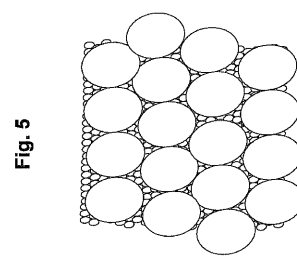


Fig. 5

【 図 4 】

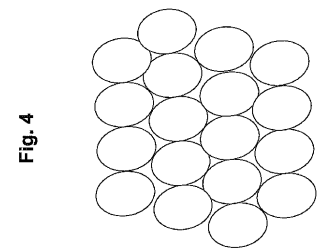
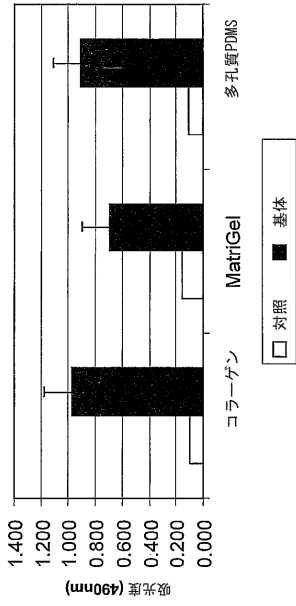
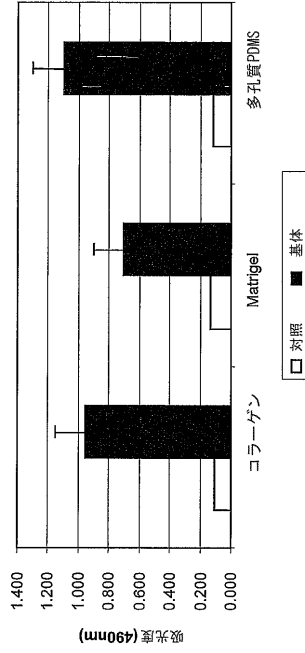


Fig. 4

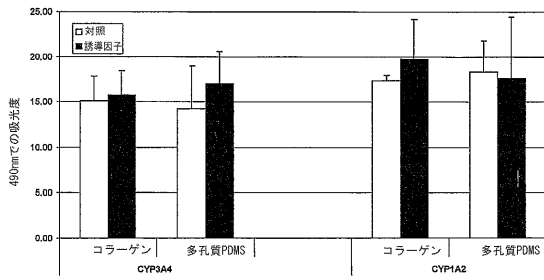
【図6】



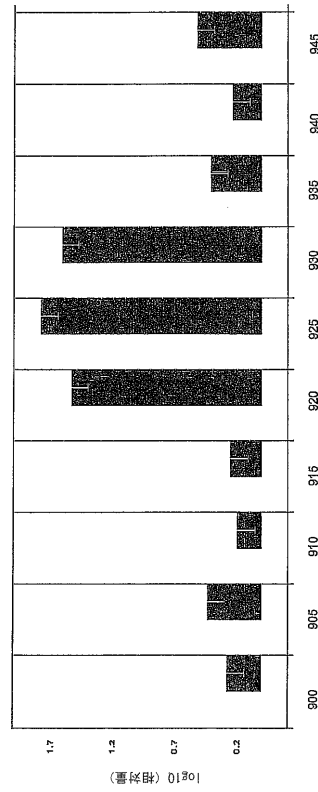
【図7】



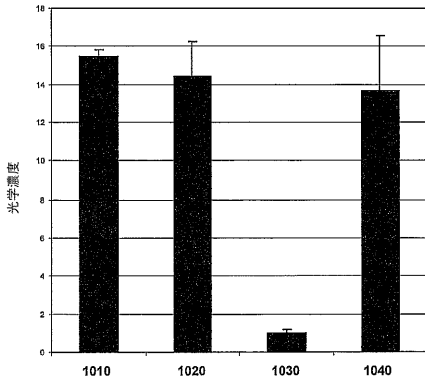
【図8】



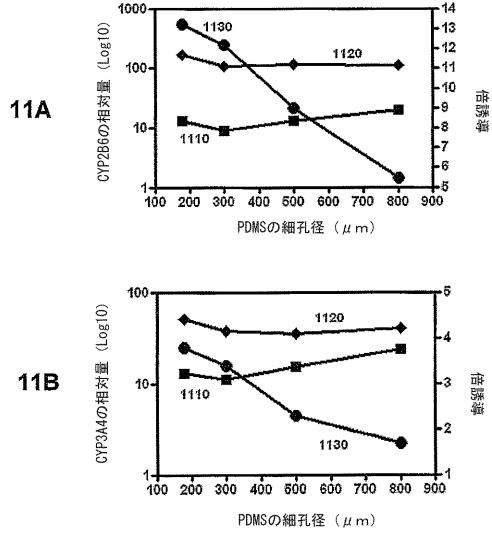
【図9】



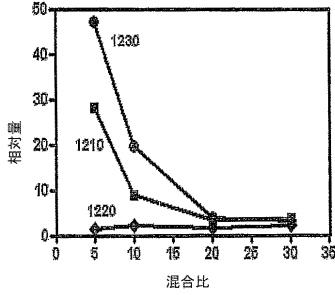
【 図 1 0 】



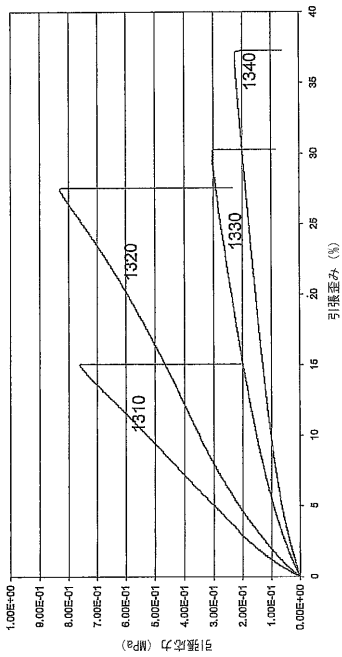
【 図 1 1 】



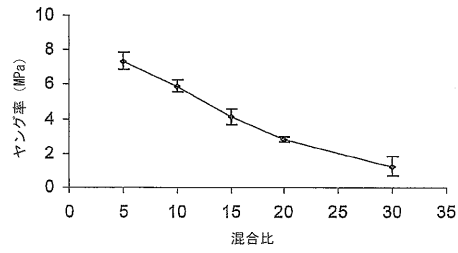
【 図 1 2 】





【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2009/065263</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C08J 9/224(2006.01); C08J 3/20(2006.01); C08J 5/00(2006.01);</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C08J, A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), Google Scholar & Keywords: 3D porous, cell culture, particulate pore-former, sugar, PDMS, transparent		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATAOKA, KEN et al., An organic-inorganic hybrid scaffold for the culture of HepG2 cells in a bioreactor, May 2005, Biomaterials, Vol. 26, Issue 15, pages 2509-2516, ISSN 0142-9612. See abstract; Materials and Methods; Fig. 1 and 4.	1-20
X	YABUTA, T. et al., Synthesis of PDMS-based porous materials for biomedical applications, Journal of Sol-Gel Science and Technology, January 2003, Vol. 26, pages 1219-1222, ISSN 0928-0707. See abstract; Experimental; Fig. 3; page 1221, right column, lines 3-7 Conclusions.	1-20
X	WO 2007/094929 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 23 Aug. 2007 See abstract; Par. [0031], [0032], [0044], [0047], [0050], [0055], and [0072] Examples; Claims.	1-20
A	GALLIGO, DANIEL et al., Multilayer micromolding of degradable polymer tissue engineering scaffolds, Materials Science and Engineering: C, 1 April 2008, Vol. 28, Issue 3, pages 353-358, ISSN 0928-4931. See the whole document.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 MAY 2010 (19.05.2010)		Date of mailing of the international search report <b>07 JUNE 2010 (07.06.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, JIN SUP Telephone No. 82-42-481-8290 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/065263**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-094929 A2	23.08.2007	EP 1991656 A2	19.11.2008
		WO 2007-094929 A3	13.12.2007
		WO 2007-094929 A3	23.08.2007

## フロントページの続き

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

(72)発明者 シドレンコ, オレクサンドル

アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 19010 プリンマー サウス プリンマー アヴェニ  
ュー 275 アpartment ジェイ40

Fターム(参考) 4B029 AA08 BB11 CC02 CC10 GA03 GB09

4B065 AA93X BC42 CA46

4F074 AA01 AA90 BB21 CB03 CB18 CC04X CC32X CC34X DA13 DA53