

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-113928

(P2018-113928A)

(43) 公開日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)		
C 1 2 N	5/00	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	4 B 0 2 9	
A 6 1 L	27/18	(2006.01)	A 6 1 L 27/18	4 B 0 6 5	
A 6 1 L	33/06	(2006.01)	A 6 1 L 33/06	3 0 0	4 C 0 8 1
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00		

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2017-7550 (P2017-7550)	(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(22) 出願日	平成29年1月19日 (2017.1.19)	(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
		(72) 発明者	長崎 幸夫 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
		(72) 発明者	池田 豊 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
		Fターム(参考)	4B029 AA08 AA21 BB11 CC01 DF10 DG10 4B065 AA90X AC20 BC41 BD50 CA60 4C081 AB06 AC12 CA281 CC01

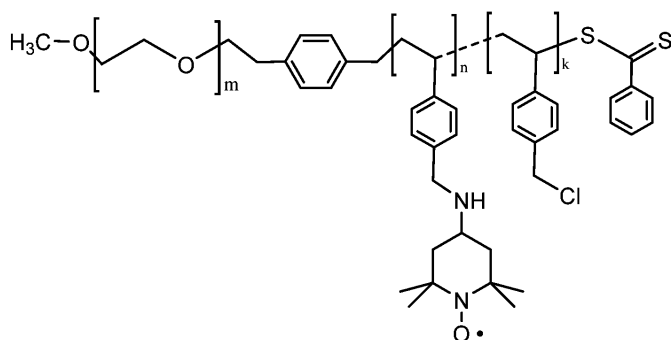
(54) 【発明の名称】 表面が生体適合性ポリマーで改質された生体物質との接触型機材

(57) 【要約】

【課題】 動物細胞の形態変化を伴うことなく細胞を処理できる表面を有する生体接触型機材の提供。

【解決手段】 式

【化 1】



で表されるポリマー：PEG - b - (MTP - r - CMS) と、
HNS - PEG - CMS (HNS：スクシンイミド化活性エステル部) または
リガンド - PEG - ポリ(エチレンイミン) との共固定化表面を有する生体接触機材。

【特許請求の範囲】

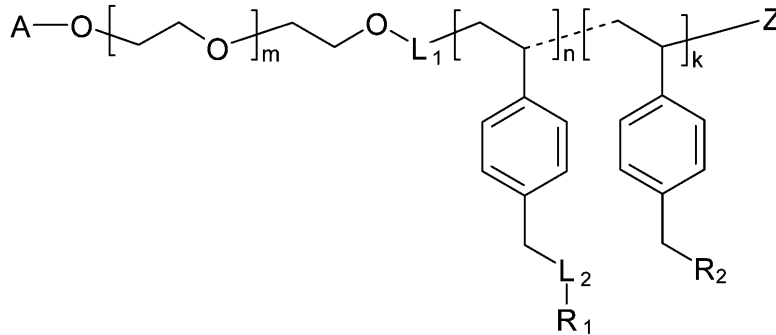
【請求項 1】

生体適合性ポリマーが固定化された表面を有する生体または生体由来物質との接触型機材であって、

生体適合性ポリマーが

(a) 式 (I)

【化 1】



10

(I)

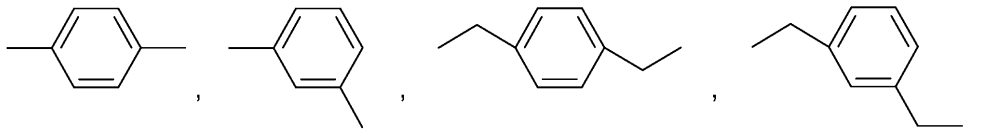
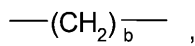
式中、

20

A は、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R' R'' CH -$ 基を表し、ここで、 R' および R'' は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R' と R'' は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ もしくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、

L_1 は、式

【化 2】



30

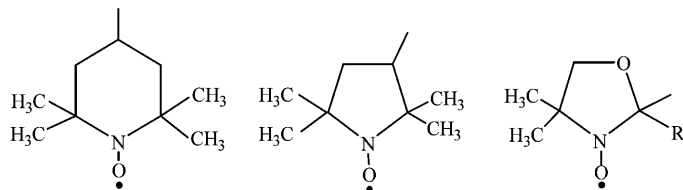
で表される基から選ばれるか、または

$-(CH_2)_2-O-L_1-$ 部分は、結合、 $-(CH_2)_a S-$ 、 $-CO(CH_2)_a S-$ 、 $-(CH_2)_a NH-$ 、 $-(CH_2)_a CO-$ 、 $-CO-$ 、 $-OCO O-$ 、 $-CONH-$ からなる群より選ばれ連結基により置換されていてもよく、

$L_2 - R_1$ は、 L_2 が $-NH-$ または $-O-$ であり、かつ、 R_1 が下式

【化 3】

40



のいずれかで表され、

R_3 はクロロまたはプロモであり、

Z は H、SH または $S(C=S) - Ph$ であり、Ph は 1 または 2 個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

50

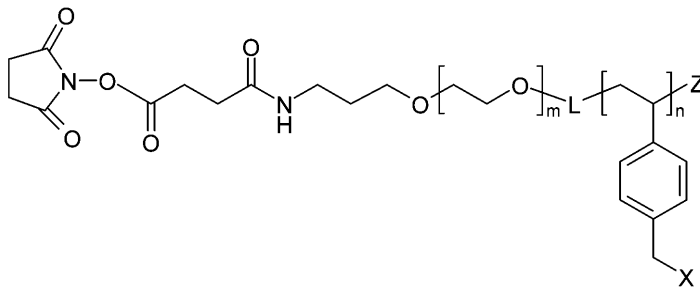
各 a は 0 ~ 5 の整数であり、
 b は 1 ~ 5 の整数であり、
 m は 5 ~ 10 , 0 0 0 の整数であり、
 n は 1 ~ 5 0 の整数であり、
 k は 1 ~ 5 0 の整数である、

ただし、n と k の付された単位 (u n i t) は、一体となって m の付された反復単位のブロックセグメントとは別のブロックセグメントを形成し、n と k の付された単位はランダムに存在する、
 で表されるコポリマーと、

(b) 式 (I I)

10

【化 4】

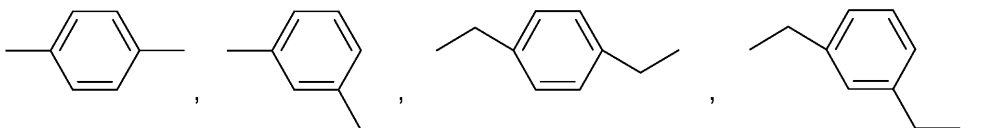
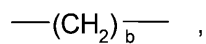
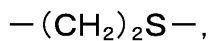


(I I)

20

式中、
 L は式

【化 5】



30

で表される基から選ばれ、

X はクロロまたはプロモであり、

Z は H、SH または S (C = S) - Ph であり、Ph は 1 または 2 個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

m は 2 ~ 10 , 0 0 0 の整数であり、

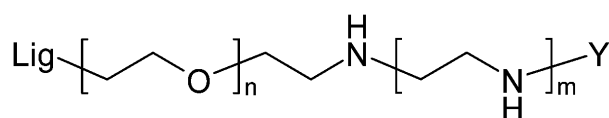
40

n は 1 ~ 1 0 0 の整数である、

で表されるコポリマー、または

式 (I I I)

【化 6】



(I I I)

50

式中、

L i g はペプチド性リガンドを表し、

Y は水素であり、

m は 1 ~ 20 の整数であり、

n は 2 ~ 10 , 000 の整数である、

で表されるコポリマーである、

前記生体または生体由来物質との接触型機材。

【請求項 2】

式 (I) の L_1 および式 (I I) の L が、パラキシリレン、メタキシリレンまたは - C H ₂ C H ₂ S - であり、式 (I I I) の L i g が A r g - G l y - A s p を含むペプチドである、請求項 1 に記載の生体または生体由来物質との接触型機材。

10

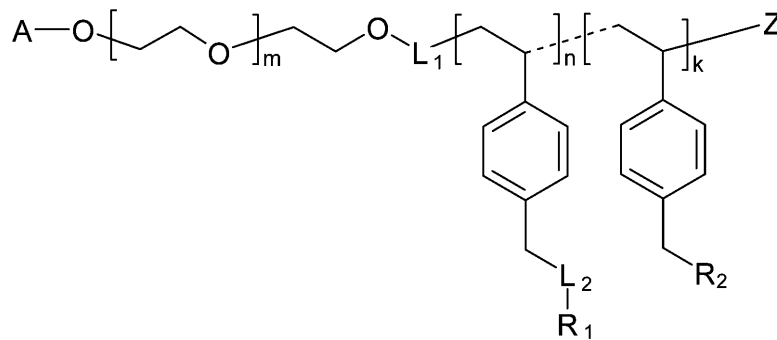
【請求項 3】

生体または生体由来物質との接触型機材の表面の改質方法であって、

当該表面に、

(a) 式 (I)

【化 7】



20

(I)

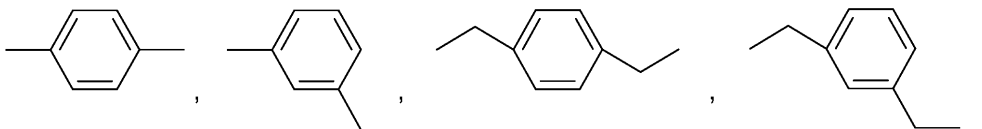
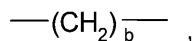
式中、

A は、非置換または置換 C₁ - C₁₂ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 R' R'' C H - 基を表し、ここで、R' および R'' は独立して C₁ - C₄ アルコキシまたは R' と R'' は一緒になって - O C H ₂ C H ₂ O - 、 - O (C H ₂)₃ O - もしくは - O (C H ₂)₄ O - を表し、

30

L₁ は、式

【化 8】



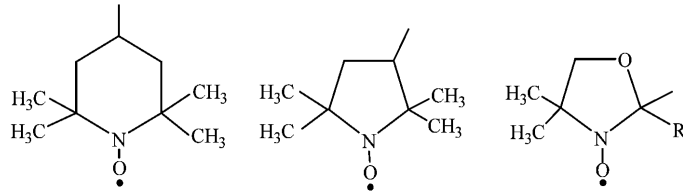
40

で表される基から選ばれるか、または

- (C H ₂)₂ - O - L₁ - 部分は、結合、 - (C H ₂)_a S - 、 - C O (C H ₂)_a S - 、 - (C H ₂)_a N H - 、 - (C H ₂)_a C O - 、 - C O - 、 - O C O O - 、 - C O N H - からなる群より選ばれ連結基により置換されていてもよく、

L₂ - R₁ は、L₂ が - N H - または - O - であり、かつ、R₁ が下式

【化 9】



のいずれかで表され、

R_3 はクロロまたはプロモであり、

Z はH、SHまたは $S(C=S)-Ph$ であり、 Ph は1または2個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、 10

各 a は 0 ~ 5 の整数であり、

b は 1 ~ 5 の整数であり、

m は 5 ~ 10, 000 の整数であり、

n は 1 ~ 50 の整数であり、そして

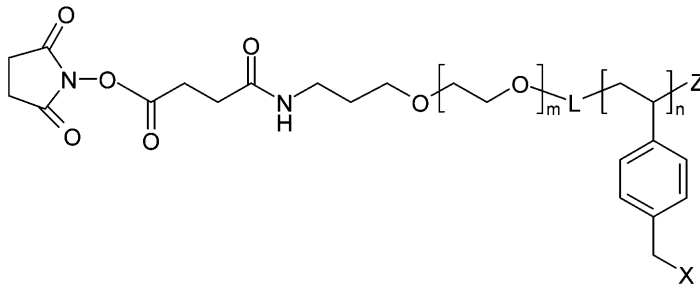
k は 1 ~ 50 の整数である、

ただし、 n と k の付された単位 (unit) は、一体となって m の付された反復単位のブロックセグメントとは別のブロックセグメントを形成し、 n と k の付された単位はランダムに存在する、

で表されるコポリマーと、 20

(b) 式 (I I)

【化 10】



30

(I I)

式中、

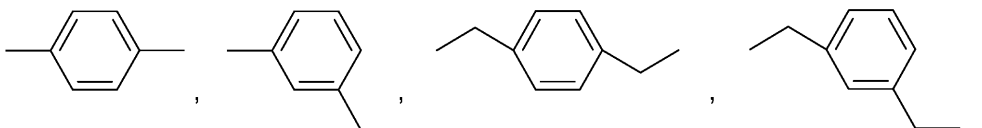
L は式

【化 11】

$-(CH_2)_2S-$,

$-(CH_2)_b-$,

40

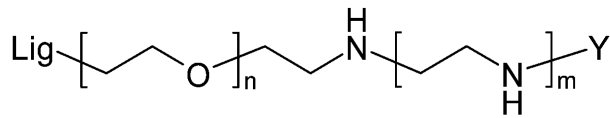


で表される基から選ばれ、

X はクロロまたはプロモであり、

Z はH、SHまたは $S(C=S)-Ph$ であり、 Ph は1または2個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、 50

mは2～10, 000の整数であり、
 nは1～100の整数である、
 で表されるコポリマー、または
 式(III)
 【化12】



(III)

10

式中、
 Ligはペプチド性リガンドを表し、
 Yは水素であり、
 mは1～20の整数であり、
 nは2～10, 000の整数である、
 で表されるコポリマー
 の水性溶液または水溶性有機溶媒の溶液をスピニングする工程
 を含んでなる、改質方法。

【請求項4】

20

請求項3に記載の改質方法であって、スピニングする工程の後に、コーティング表面を大気圧低温プラズマ照射する工程をさらに含んでなる、改質方法。

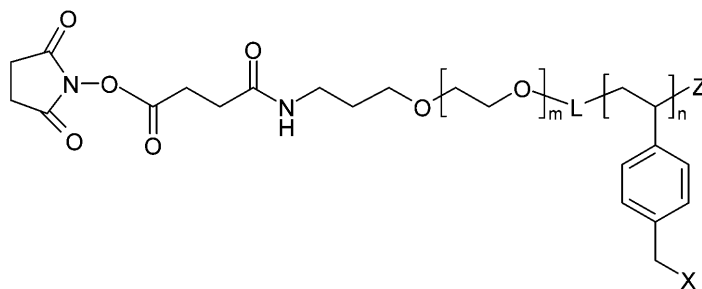
【請求項5】

請求項3または4に記載の改質方法であって、式(II)に記載のポリマーを用いる場合に、大気圧低温プラズマ照射してリガンドを表面の活性エステルを介して表面に導入する工程をさらに含んでなる、改質方法。

【請求項6】

式(II)

【化13】



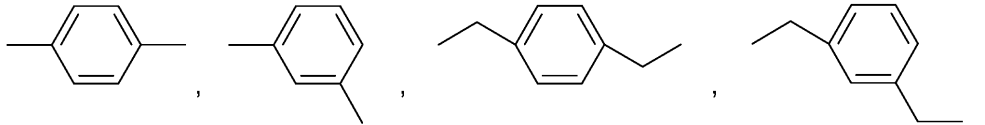
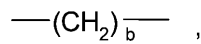
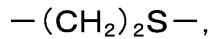
(II)

30

式中、
 Lは式

40

【化 1 4】



10

で表される基から選ばれ、

Xはクロロまたはプロモであり、

ZはH、SHまたはS(C=S)-Phであり、Phは1または2個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

mは2～10,000の整数であり、

nは1～100の整数である、

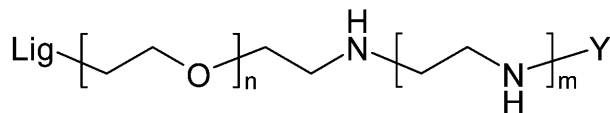
で表されるコポリマー。

【請求項 7】

式 (I II)

20

【化 1 5】



(I II)

式中、

Ligはペプチド性リガンドを表し、

Yは水素であり、

30

mは1～20の整数であり、

nは2～10,000の整数である、

で表されるコポリマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、親水部がポリエチレングリコール(PEG)、疎水部がポリスチレンからなり、その疎水部側鎖にラジカル消去機能を有する環状ニトロキシドラジカルおよび八ロメチレンがそれぞれ共有結合したコポリマーと末端にリガンドまたは活性エステル基を有するPEG鎖含有ポリマーとが表面に固定された生体または生体由来物質との接触型機材、並びに前記ポリマーによる当該機材表面の改質方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

親水部がポリエチレングリコール(PEG)、疎水部がポリスチレンからなり、その疎水部側鎖にラジカル消去機能を有する環状ニトロキシドラジカルを含むコポリマーは、環状ニトロキシドラジカルが高分子化されることにより生体環境下で安定性を獲得した上で、ニトロキシドラジカルが発揮し得るレドックス機能を利用して、生体内における過剰な活性酸素等の産生、存在に起因するとみなせる各種障害を予防または治療できることが確認されている(例えば、特許文献1参照)。また、PEGとのブロックコポリマーは記載されていないものの、具体的には、環状ニトロキシドラジカルおよびクロロメチレンをポ

50

リスチレンの側鎖に有するポリマーを溶媒留去法によりガラスビーズ表面に固定し、表面を改質出来ることも知られている（特許文献2）。さらには、かようなポリマーを、特許文献3（または特願2008-238133明細書）に記載の大気圧プラズマ処理により当該クロロメチレンのクロロ基を介してポリマーを表面に固定できることも特許文献2には記載されている。一方、細胞培養デバイス表面にPEG-b-ポリ（環状ニトロキシドラジカル-NH-メチルスチレン）を含むブロックコポリマーを固定することで、当該表面が動物細胞の形態変化（例えば、分化、細胞死）を伴うことなく細胞培養を行なえるように改質できることが知られている。当該固定は、従来報告されているコーティング法では、安定に行うことができないとの理由から、当該表面に存在するカルボキシル基と環状ニトロキシドラジカル-NH-メチル中の-NH-を縮合剤により共有結合することにより行われている（特許文献4）。

10

【0003】

しかし、縮合剤の使用は、その毒性及び操作の煩雑さに課題があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】WO 2009/133647

【特許文献2】特開2009-235723号公報

【特許文献3】特開2012-70615号公報

【特許文献4】特開2015-213446号公報

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

生体または生体由来物質と接触する機材表面に各種機能を付与するための生体適合性ポリマーとして多種多様なポリマーが提案されている。特許文献4に記載のPEG-b-ポリ（環状ニトロキシドラジカル-NH-メチルスチレン）を含むブロックコポリマーはそれらの一例であるが、当該表面にさらなる機能を簡易、かつ、安定に付与できる手段についてのニーズは依然として存在するであろう。したがってかような手段を提供することが本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

前記ブロックコポリマーは、前述したとおり、特に、動物細胞を培養する際に、細胞の形態変化（例えば、分化、細胞死）を惹起しないように培養表面を改質できる。本発明者等は、前記ブロックコポリマーが、水性媒体中で高い可動性を有するPEG鎖を有するにもかかわらず、疎水性部側鎖に積極的にハロメチルスチレン部を含ませる（または残存させる）ことにより、単に、スピンコーティングするだけで、少なくとも細胞の培養条件下で市販の培養皿表面やポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル等の基板表面に安定に固定できることのみならず、一定の、別の機能性（リガンド結合性または活性エステル化）ポリマーも安定に共固定できることを見出したこと。さらに、こうして固定されたポリマー組成物に大気圧プラズマ照射すると、前記機能に悪影響を及ぼすことなく固定を強固にし得ることも見出した。例えば、前記機能として活性エステル化したポリマーは、かようなプラズマ照射により悪影響を受けないものの、エステル形成可能なペプチド等の官能基を有する化合物を共存させてプラズマ照射をすると、ポリマーが固定された表面にペプチド等を導入することが出来ることを見出した。なお、積極的にハロメチルスチレン部を含ませる（または残存させる）といているのは、特許文献4で使用されるブロックコポリマーのポリエチレン疎水性部にハロメチルスチレン部が残存し得ることが記載されていることが考慮されている。

40

【0007】

したがって、本発明として以下の態様の発明を提供する。

(1) 生体適合性ポリマーが固定化された表面を有する生体または生体由来物質との接

50

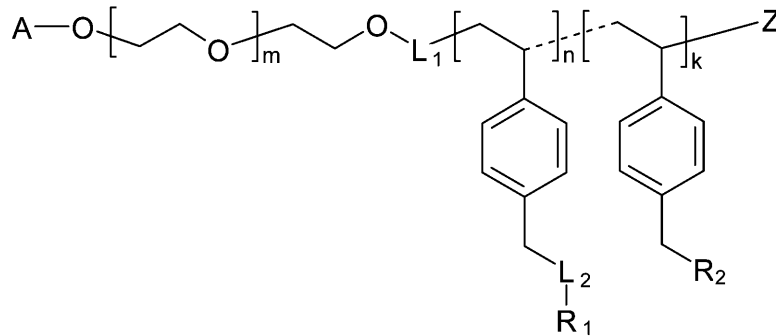
触型機材であって、

生体適合性ポリマーが

(a)式(I)

【0008】

【化1】



10

(I)

【0009】

式中、

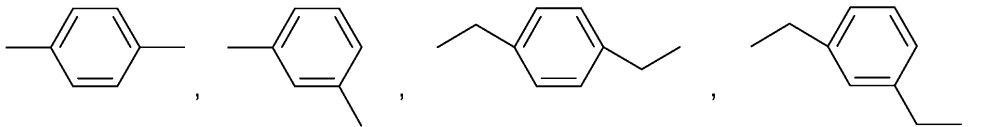
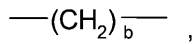
Aは、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R'R''CH-$ 基を表し、ここで、 R' および R'' は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R' と R'' は一緒になって $-OCH_2CH_2O-$ 、 $-O(CH_2)_3O-$ もしくは $-O(CH_2)_4O-$ を表し、

20

L_1 は、式

【0010】

【化2】



30

【0011】

で表される基から選ばれるか、または

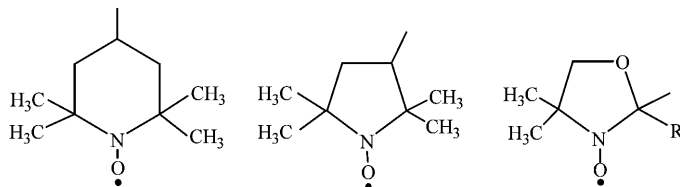
$-(CH_2)_2-O-L_1-$ 部分は、結合、 $-(CH_2)_aS-$ 、 $-CO(CH_2)_aS-$ 、 $-(CH_2)_aNH-$ 、 $-(CH_2)_aCO-$ 、 $-CO-$ 、 $-OCOO-$ 、 $-CONH-$ からなる群より選ばれ連結基により置換されていてもよく、

L_2-R_1 は、 L_2 が $-NH-$ または $-O-$ であり、かつ、 R_1 が下式

40

【0012】

【化3】



【0013】

のいずれかで表され、

50

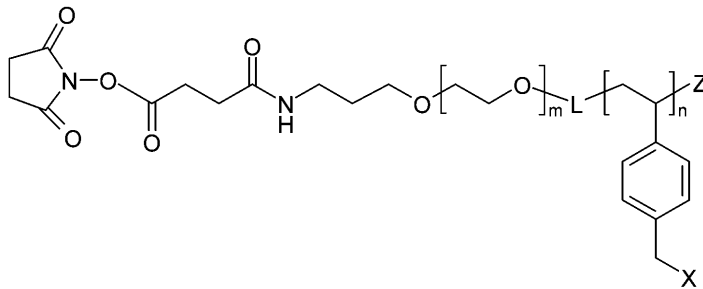
R_3 はクロロまたはプロモであり、
 Z は H、SH または $S(C=S)-Ph$ であり、 Ph は 1 または 2 個のメチルまたはメ
 トキシで置換されていてもよいフェニルを表し、
 各 a は 0 ~ 5 の整数であり、
 b は 1 ~ 5 の整数であり、
 m は 5 ~ 10, 000 の整数であり、
 n は 1 ~ 50 の整数であり、そして
 k は 1 ~ 50 の整数である、
 ただし、 n と k の付された単位 (unit) は、一体となって m の付された反復単位の
 ブロックセグメントとは別のブロックセグメントを形成し、 n と k の付された単位はラン
 ダムに存在する、
 で表されるコポリマーと、

10

(b) 式 (II)

【0014】

【化4】



20

(II)

【0015】

式中、

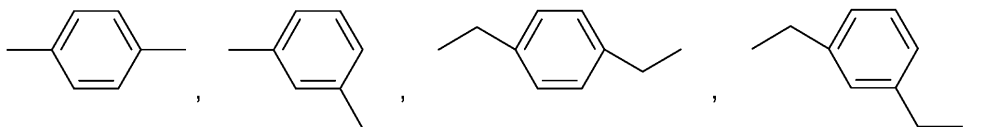
L は式

【0016】

30

【化5】

 $-(CH_2)_2S-$,

 $-(CH_2)_b-$,


40

【0017】

で表される基から選ばれ、

 X はクロロまたはプロモであり、

 Z は H、SH または $S(C=S)-Ph$ であり、 Ph は 1 または 2 個のメチルまたはメ
 トキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

 m は 2 ~ 10, 000 の整数であり、

 n は 1 ~ 100 の整数である、

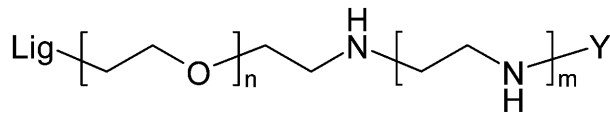
で表されるコポリマー、または

式 (III)

50

【 0 0 1 8 】

【 化 6 】



(I I I)

【 0 0 1 9 】

式中、

L i g はペプチド性リガンドを表し、

Y は水素であり、

m は 2 ~ 2 0 の整数であり、

n は 2 ~ 1 0 , 0 0 0 の整数である、

で表されるコポリマーである、

前記生体または生体由来物質との接触型機材。

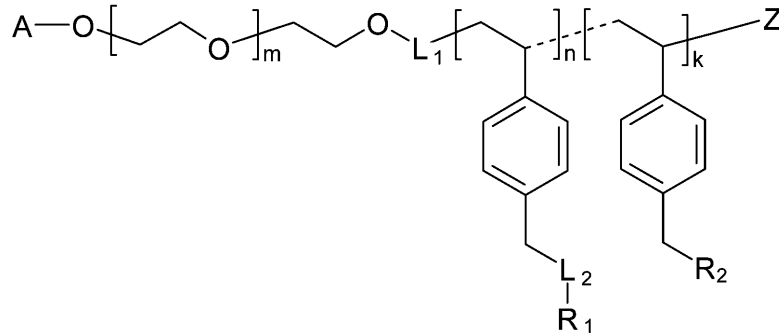
(2) 式 (I) の L_1 および式 (I I) の L が、パラキシリレン、メタキシリレンまたは $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$ であり、式 (I I I) の L i g が A r g - G l y - A s p を含むペプチドである、上記 (1) に記載の生体または生体由来物質との接触型機材。

(3) 生体または生体由来物質との接触型機材の表面の改質方法であって、当該表面に、

(a) 式 (I)

【 0 0 2 0 】

【 化 7 】



(I)

【 0 0 2 1 】

式中、

A は、非置換または置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシを表し、置換されている場合の置換基は、ホルミル基、式 $R' R'' \text{CH}-$ 基を表し、ここで、 R' および R'' は独立して $C_1 - C_4$ アルコキシまたは R' と R'' は一緒になって $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{O}-$ もしくは $-\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}-$ を表し、

 L_1 は、式

【 0 0 2 2 】

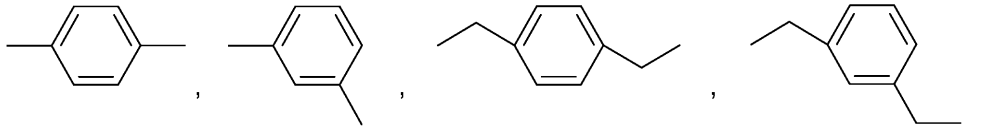
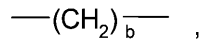
10

20

30

40

【化 8】



【 0 0 2 3 】

10

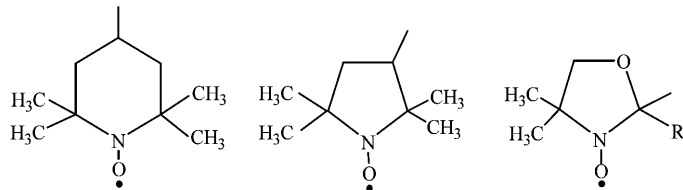
で表される基から選ばれるか、または

- (CH₂)₂-O-L₁- 部分は、結合、-(CH₂)_aS-、-CO(CH₂)_aS-、-(CH₂)_aNH-、-(CH₂)_aCO-、-CO-、-OCO-、-CONH- からなる群より選ばれ連結基により置換されていてもよく、

L₂-R₁は、L₂が-NH-または-O-であり、かつ、R₁が下式

【 0 0 2 4 】

【化 9】



20

【 0 0 2 5 】

のいずれかで表され、

R₃はクロロまたはプロモであり、

ZはH、SHまたはS(C=S)-Phであり、Phは1または2個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

各 a は 0 ~ 5 の整数であり、

30

b は 1 ~ 5 の整数であり、

m は 5 ~ 10, 000 の整数であり、

n は 1 ~ 50 の整数であり、そして

k は 1 ~ 50 の整数である、

ただし、nとkの付された単位 (unit) は、一体となってmの付された反復単位のブロックセグメントとは別のブロックセグメントを形成し、nとkの付された単位はランダムに存在する、

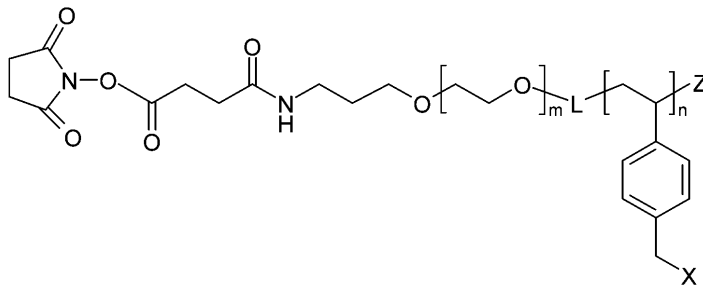
で表されるコポリマーと、

(b) 式 (II)

【 0 0 2 6 】

40

【化10】



(I I)

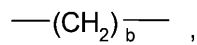
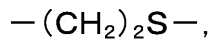
10

【0027】

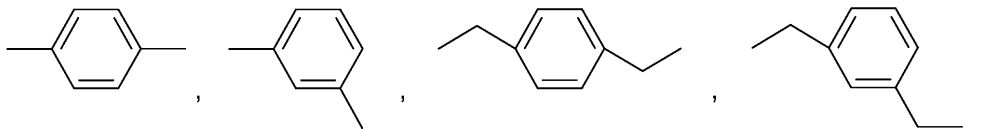
式中、
L は式

【0028】

【化11】



20



【0029】

で表される基から選ばれ、

X はクロロまたはプロモであり、

30

Z は H、SH または S (C = S) - P h であり、P h は 1 または 2 個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

m は 2 ~ 10 , 0 0 0 の整数であり、

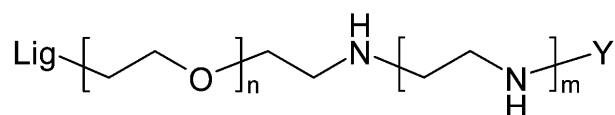
n は 1 ~ 1 0 0 の整数である、

で表されるコポリマー、または

式 (I I I)

【0030】

【化12】



(I I I)

40

【0031】

式中、

L i g はペプチド性リガンドを表し、

Y は水素であり、

m は 2 ~ 2 0 の整数であり、

n は 2 ~ 1 0 , 0 0 0 の整数である、

50

で表されるコポリマー

の水性溶液または水溶性有機溶媒の溶液をスピニングする工程を含んでなる、改質方法。

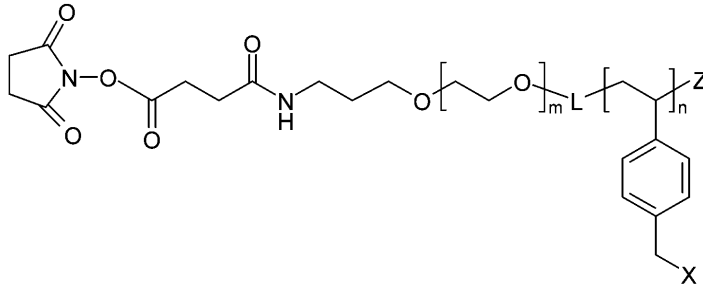
(4) 上記(3)に記載の改質方法であって、スピニングする工程の後に、コーティング表面を大気圧低温プラズマ照射する工程をさらに含んでなる、改質方法。

(5) 上記(3)または(4)に記載の改質方法であって、式(II)に記載のポリマーを用いる場合に、大気圧低温プラズマ照射してリガンドを表面の活性エステルを介して表面に導入する工程をさらに含んでなる、改質方法。

(6) 式(II)

【0032】

【化13】



(II)

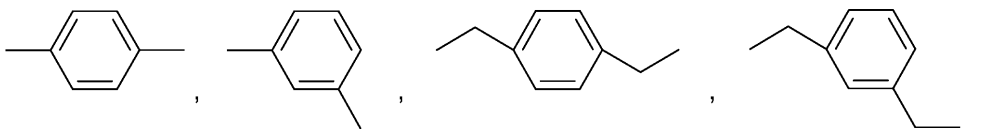
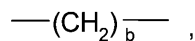
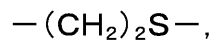
【0033】

式中、

Lは式

【0034】

【化14】



【0035】

で表される基から選ばれ、

Xはクロロまたはプロモであり、

ZはH、SHまたはS(C=S)-Phであり、Phは1または2個のメチルまたはメトキシで置換されていてもよいフェニルを表し、

mは2~10, 000の整数であり、

nは1~100の整数である、

で表されるコポリマー。

(7) 式(III)

【0036】

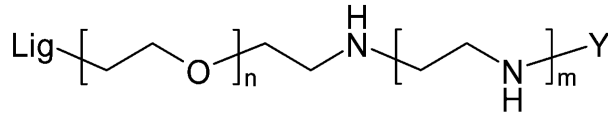
10

20

30

40

【化 15】



(I I I)

【 0 0 3 7 】

式中、

L i g はペプチド性リガンドを表し、

Y は水素であり、

m は 1 ~ 2 0 の整数であり、

n は 2 ~ 1 0 , 0 0 0 の整数である、

で表されるコポリマー。

10

【 0 0 3 8 】

上記の式 (I I) 及び式 (I I I) のコポリマーは、それぞれの反復単位がブロックセグメントを形成するブロックコポリマーである。

【 発明の効果 】

【 0 0 3 9 】

本発明によれば、生体または生体由来物質との接触型機材であって、その表面に式 (I) のコポリマーと式 (I I) のコポリマーまたは式 (I I I) のコポリマーが安定に固定されており、各ポリマーが有する機能を発揮する機材を簡易に提供できる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 0 】

【 図 1 】 例 1 の処理表面の評価試験 (1) の顕微鏡観察写真である。

【 図 2 】 上記評価試験 (1) における、トリプシンで処理した後に細胞数を示すグラフである。

【 図 3 】 例 1 の処理表面の評価試験 (2) の顕微鏡観察写真である。

【 図 4 】 例 2 の処理表面の評価試験の顕微鏡観察写真である。

【 図 5 】 例 3 の処理表面の評価試験の顕微鏡観察写真である。

30

【 図 6 】 例 4 の各処理条件および表面の顕微鏡観察結果を示す。

【 図 7 】 例 5 の各処理表面の接触角測定結果を示す。

【 図 8 】 例 6 の生成物 1 の ^1H NMR スペクトルである。【 図 9 】 例 6 の生成物 2 の ^1H NMR スペクトルである。

【 発明の詳細な記述 】

【 0 0 4 1 】

生体または生体由来物質は、動物細胞、器官、臓器、血液 (血漿若しくは血清を含む) 、尿、唾液、等を意味する。したがって、生体または生体由来物質との接触型機材としては、生体成分検出器、血液パック、細胞培養機材、インプラント材料等が想定されており、それらの表面の材質は、親水性等の適当な特性付与処理が施されていてもよいポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル等製であることができる。

40

【 0 0 4 2 】

・コポリマーについて

式 (I) で表せるコポリマーは、式中、A は、非置換 C_{1-12} アルコキシが好ましく、 C_{1-6} アルコキシがより好ましく、 C_1 アルコキシ (メチル) が最も好ましい。A の定義に限定されるものでなく、本発明全体を通して、 $\text{C}_a - z$ アルコキシ若しくはアルキルのように表示される場合、炭素原子数 a 個 ~ z 個を有する直鎖若しくは分岐のアルコキシ若しくはアルキルを意味し、アルキル部分若しくはアルキルとしては、限定されるものでないが、メチル、エチル、n - プロピル、i s o - プロピル、n - ブチル、s e c - ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、デシル、ウンデシル等を挙げることができる。

50

【0043】

L_1 としては、パラキシリレン若しくはメタキシリレン、または $-(CH_2)_2S-$ の連結基であることが好ましい。本発明に関連するポリマーにおいて、 L_1 の基の様に結合の方向性により、異なる意味を有する場合には、記載された方向性において結合するものと意図されており、例えば、 $-(CH_2)_2S-$ の連結基にあっては、S原子が式(I)のnの付された反復単位と結合することを意味する。式(I)のmは、好ましくは8~1000の整数であり、より好ましくは12~500の整数であり、nは好ましくは4~30、より好ましくは4~20であり、kは好ましくは4~30、より好ましくは4~20である。

【0044】

前記コポリマーは、限定されるものでないが、都合よくは、その親水部がポリエチレングリコール(PEG)、疎水部がポリスチレンを含んでなり、その疎水部側鎖に八口メチレン、特にクロロメチルを含む共重合体(以下、PEG-b-PCMSともいう)を原料とし、PCMSの八口メチレンの一部を介して環状ニトロキシドラジカルを共有結合的に導入することにより提供できる。PEG-b-PCMSは、一般的には、WO 2016/052463または前記特許文献1に記載された方法により製造できる。また、環状ニトロキシドラジカルを共有結合的に導入する方法もこれらの特許文献に記載の方法を利用することができる。

10

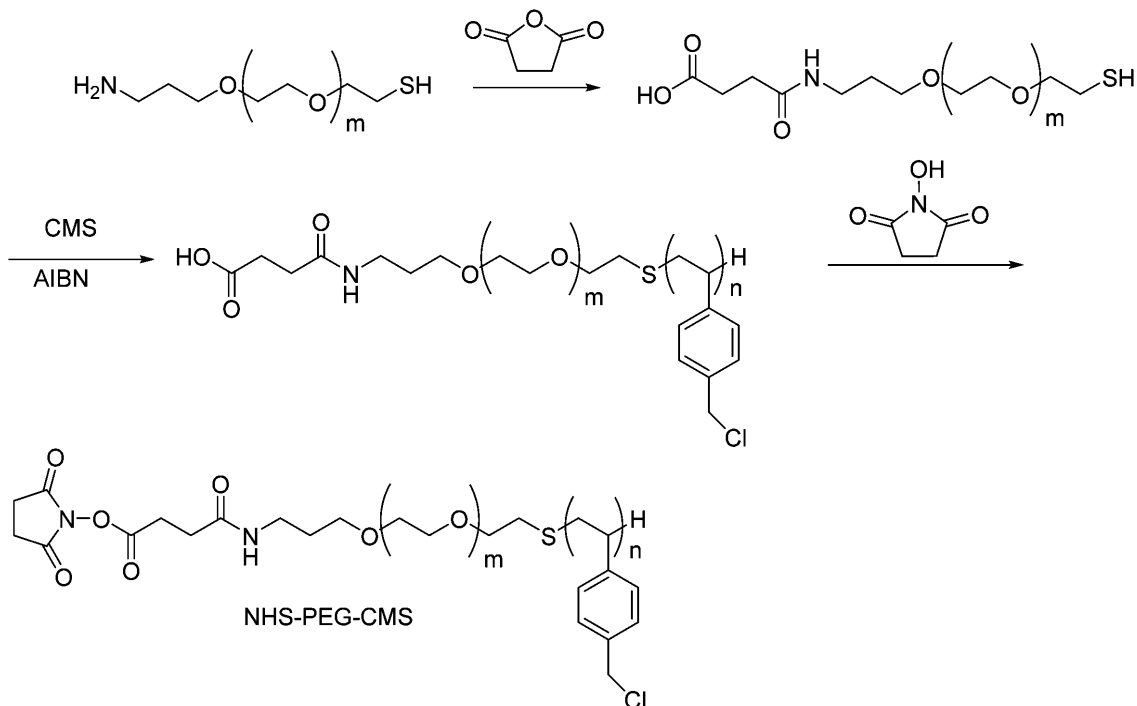
【0045】

式(II)で表されるコポリマーは、PEG-PCMSに相当するポリマーのPEG末端の官能基を利用し。限定されるものでないが、それ自体公知の各反応を利用して、下記反応スキームを参照して製造できる。

20

【0046】

【化16】



30

40

【0047】

上記のNHS-PEG-CMSは、mが約110であり、nが5であるものを、以下では、NHS-PEG-CMSと称することがある。

【0048】

式(III)のコポリマーについて、式中のmは3以上であることが好ましく、nは好ましくは8~1000の整数であり、より好ましくは12~500の整数である。Lig

50

は各種動物細胞の表面受容体等に特異的に結合するペプチド性リガンドであることができる。ペプチド性とは、ペプチドをベースとすることを意味する。リガンドの具体的なものとしては、限定されるものでないが、Arg-Gly-Asp-(REG-)、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-(RGDS-)をはじめとする、Arg-Gly-Aspを含有するペプチドを挙げることができる。当該コポリマーは具体的には後述する方法に基づき、またはそれを改良して製造することができる。REG-(CH₂CH₂O)_nNH(CH₂CH₂NH)₃Hと略記でき、nが約227であるポリマーを以下、N442と称することもある。なお、RGDペプチド：フィブロネクチンの一部であり、細胞接着を促進する機能を有する。

【0049】

10

・これらのポリマーの表面へ固定

これらのポリマーはいずれも水溶性有機溶媒、例えば、メタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド(DMF)、テトラヒドロフラン(THF)等に溶解し、溶液を生体または生体由来物質との接触型機材の表面へ、それ自体公知のスピンコーティング法によりコーティングすればよい。例えば、生体または生体由来物質との接触型機材として市販の培養皿(コーニング社製)の表面へ周囲温度(25~35)にて、1000rpm~2500rpmにて、30秒~数分間コーティングすればよい。

【0050】

このようなコーティングで使用される式(I)のコポリマーと式(II)又は式(III)のコポリマーの使用割合は、具体的に使用するポリマーの種類およびそれらの使用目的に応じて、最適割合が変動するので特定できないが、一般的に、重量比によれば、5~9:1~5、好ましくは、8~9:1~2、より好ましくは9~9.9:0.1~1であることができる。

20

【0051】

・リガンドを表面に導入する方法は、式(II)のポリマーの活性エステル部を利用してリガンドをあらかじめ当該ポリマーに結合させておくか、または式(III)のポリマーを使用して、式(I)のポリマーと共に、改質することを意図する表面にスピンコーティングして共固定すればよい。本発明によれば、かような共固定後の表面に大気圧プラズマ照射することにより固定を強固にできるが、リガンドの機能や活性エステル基の活性に悪影響を及ぼさない。別法としては、表面に、式(II)のポリマーを式(I)のポリマーと共に固定し、大気圧プラズマ照射した後、さら大気圧プラズマ処理してリガンドを表面に導入することができる。したがって、この別法によると、活性エステルと当該プラズマ照射下で反応し得る官能基、例えば、アミノ、ヒドロキシル等を有する化合物または物質を目的の表面に導入することができる。これらの化合物または物質は各種低分子リガンドの他、高分子物質、抗体等を包含する。

30

【実施例】

【0052】

以下、より具体的な態様により本発明を説明するが、本発明をこれらに限定すること意図するものでない。

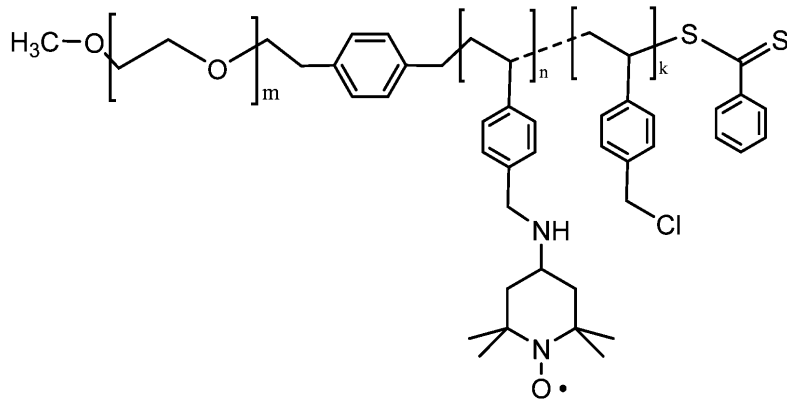
【0053】

40

以下、説明を簡略化する目的で、式(I)のポリマーとして、

【0054】

【化 17】



10

【0055】

式中、 m が約115であり、 n が約3であり、 k が4.5であるポリマー（以下、N454という。）で表される、ポリマーを使用し、

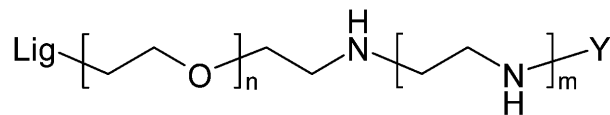
式（II）のポリマーとしては、NHS-PEG-CMSは、 m が約114であり、 n が4であるポリマー（以下、NHS-PEG-CMSという。）を使用し、

式（III）のポリマーとしては、次式

【0056】

20

【化 18】



【0057】

で表され、LigがRDG-であり、 n が227であり、 m が3であるポリマー（N442という）を使用した。

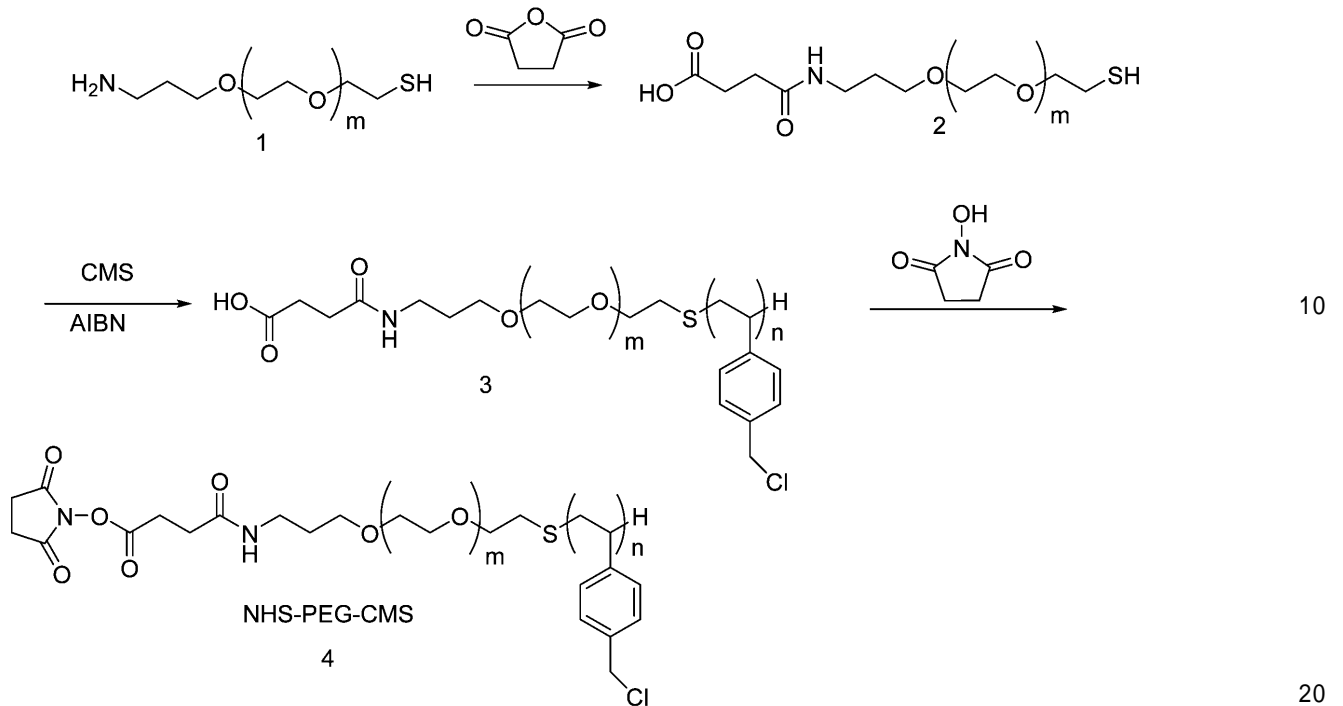
【0058】

また、かようなポリマーは次の反応スキームに従い合成した。

30

【0059】

【化 19】



【0060】

化合物 1 (SUNBRIGHT SH-050PA) 100 mg をテトラヒドロフラン (5 mL) とメタノール (1 mL) の混合液に加え無水コハク酸 (20 mg)、トリエチルアミン (100 μ L) を加え室温で 12 時間反応後、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を 2 mL 加えさらに二時間反応させる。溶媒をエバポレーションにより除いたのちに飽和塩化ナトリウム水溶液とクロロホルムで分液し、抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残留物をイソプロパノールで再沈殿を行うことで目的化合物 2 を 109 mg 得た。

【0061】

化合物 2 にアゾビスイソブチロニトリル (2 mg) を加え窒素置換操作を行った後にトルエン (1 mL) およびクロロメチルスチレン (22 μ L) を加え、60 $^{\circ}$ C において 24 時間反応させた。反応後、イソプロパノールで再沈殿を行うことで目的化合物 3 を 80 mg 得た。

【0062】

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)
 7.24 - 6.16 ppm (m, 16 H), 4.67 - 4.27 ppm (m, 8 H), 3.83 - 3.45 ppm (s, 470 H), 3.38 ppm (m, 2 H), 3.05 (t, 1 H) 2.81 ppm (t, 1 H), 2.60 ppm (m, 4 H), 2.42 (t, 2 H), 2.00 - 1.50 ppm (m, 12 H)

【0063】

化合物 3 (70 mg) をジメチルホルムアミド (500 μ L) に溶解させ N-ヒドロキシスクシンイミド (2 mg)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (4 mg) を加え 0 $^{\circ}$ C において 1 時間その後室温において 3 時間反応させた。反応後、イソプロパノールで再沈殿を行うことで目的化合物 4 を 65 mg 得た。

【0064】

例 1: スピンコート法

N454 および N442 を 10 mg/mL の濃度でメタノールに溶解させ、0.45 μ m のフィルターを通して不溶物を除去した。下記の割合で混合し、そのうち 30 μ L をスピンコート法によりコーティングした。コート条件は 2000 rpm、60 秒で行った。

コート後乾燥させ、乾燥した後にメタノール（1ml）で20回洗浄を行い、洗浄後乾燥させて細胞培養に用いた。

【0065】

処理条件を表1に示す。

【0066】

【表1】

表1：

	①	②	③	④
N454(μl)	30	30	30	30
N442(μl)	0	0.1	1	3

10

【0067】

評価試験（1）

上記の方法で作成した培養皿（コーニング社製）にインテグリン発現株であるHepG2を 1×10^5 細胞を播種し一晩培養し顕微鏡により観察を行った。結果を表す図に代わる写真を図1に示す。

【0068】

図1から、1および2に関しては細胞が丸く浮いており、接着していない（洗浄するとほとんどなくなる）。一方で3、4に関しては安定に接着していることが確認できた。再現もよく、3回行ったがいずれの試行も同様の結果であった。

20

【0069】

PBSで2回洗浄を行い、トリプシンで処理した後に細胞数を数えた。コントロールと比較した。結果を図2に示す。

【0070】

評価試験（2）

同様にMiaPaCa2を用いて細胞の接着性について評価した。結果を表す図に代わる写真を図3に示す。

【0071】

上記の結果より、リガンド修飾したポリマーを10%（重量基準）程度加えると定量的に細胞が安定にコーティングできていることが確認できた。

30

【0072】

例2：リガンド導入NHS-PEG-CMSの共コーティング

コーティングポリマーとして用いたNHS-PEG-CMSは、上記式中、mが約114であり、nが5である。

【0073】

最初に活性エステル部位へのリガンド導入および培養皿へのコーティングの可否を検討するためにフィブロネクチンの活性フラグメントであるGRGDSを反応させた。簡潔には、NHS-PEG-CMS（1mg/ml）にペプチド（最終濃度：1mg/ml）を生理食塩水中で反応させた。こうして得られた反応生成物（10μl）に454（10mg/ml，20μl）を加えて培養皿へスピンコートを行った。洗浄はメタノールで5回行った。コントロールとしてはペプチドと反応させていないNHS-PEG-CMSを同様に加えてコーティングした。例1の評価試験（1）と同様にHepG2を接着させ、接着表面を観察した。試験の結果を示す図に代わる顕微鏡写真を図4に示す。図4から、ペプチドと反応させたポリマーを共固定させた場合のみHepG2細胞が接着していることが確認された。

40

【0074】

例3：NHS-PEG-CMSのコーティング後のペプチドの導入

NHS-PEG-CMSの表面へのコーティング後、ペプチド（GRGDS）の水溶液をコーティング表面へ加えて反応させた。

50

【 0 0 7 5 】

具体的には、N 4 5 4 (1 0 m g / m l) 3 0 μ L をコーティングした後に、N H S - P E G - C M S (1 0 m g / m l) 3 0 μ L をコーティングし、コーティング後、ペプチド (1 m g / m l) の水溶液をコーティング表面へ加え 6 時間反応後細胞を播種した。比較のために、N H S - P E G - C M S をコーティングしただけの表面も作製し、同様に細胞を播種した。これらの表面を、顕微鏡観察した結果を示す図に代わる写真を図 5 に示す。図 5 から、N H S - P E G - C M S をコーティングした表面は細胞接着が見られなかったが、H S - P E G - C M S をコーティングした後、ペプチドを反応させたものは細胞が接着したことが確認できた。

【 0 0 7 6 】

具体的には、図 5 の左：N 4 5 4 をコーティングした後に N H S - P E G - C M S をコーティングし生理食塩水を加えたもの。中央：N 4 5 4 をコーティングした後にペプチドを加えたもの (N H S - P E G - C M S ポリマーなし)。右：N 4 5 4 をコーティングした後に N H S - P E G - C M S をコーティングしペプチドを反応させたもの。細胞接着には N H S - P E G - C M S ポリマーコーティングとペプチドが必要であることがわかる。

【 0 0 7 7 】

例 4：プラズマ処理の検討

用いたポリマーは、P E G - b - P (M T P - r - C M S) (N 4 5 4) および N H S - P E G - P C M S である。

【 0 0 7 8 】

各ポリマー溶液 (1 0 m g / m L のメタノール溶液) を用意した。下記組成で混合し、細胞培養皿にスピンコートを行った。

【 0 0 7 9 】

組成を次の表 2 に示す。

【 0 0 8 0 】

【表 2】

表 2：

PEG-b-P(MTP-r-CMS)	NHS-PEG-PCMS
20 μL	0 (濃度を合わせるために MeOH 10 μL)
20 μL	10 μL

【 0 0 8 1 】

スピンコートした培養皿を下記の様に処理し、H e p G 2 細胞を播種し、細胞接着性を見た。

- ・プラズマ処理：大気圧プラズマ。8 0 V , 3 0 s e c , H e : 2 . 5 L / 分
- ・メタノール洗浄
- ・R G D ペプチドとの反応。0 . 5 m g / m l の生理食塩水。3 時間反応。

【 0 0 8 2 】

各処理条件および表面の顕微鏡観察結果を図 6 に示す。

【 0 0 8 3 】

図 6 から、活性エステル部位を有するポリマー N H S - P E G - b - P C M S をプラズマ照射し、R G D と反応させた場合にのみ細胞が接着していることが確認できた。

【 0 0 8 4 】

例 5：種々の平板基材へのプラズマコーティング

下記手順を平板及び培養皿へのプラズマコーティング後に行った。

【 0 0 8 5 】

各処理手順

1. 平板をメタノール洗浄
2. 1. の後、P E G - b - P (M T P - r - C M S) (1 0 m g / m l) をスピンコー

10

20

30

40

50

ティング

3. 2の後、コーティング表面のプラズマ照射（ポリエチレンおよびポリプロピレン：30秒、ポリスチレンおよびポリ塩化ビニル：2分）

4. 3の後、表面をメタノール洗浄

【0086】

各表面の接触角測定の結果を図7に示す。図7から、ポリマーをコーティングし、プラズマ照射したものは、いずれも接触角が40度程になり、親水性が増している。ポリマーコート後プラズマ照射していないもの（サンプル3）は親水性の増加がみられないことからプラズマ照射なしではコーティングされておらず、プラズマ照射によってポリマーが安定に表面にコーティングされていることが確認できた。

10

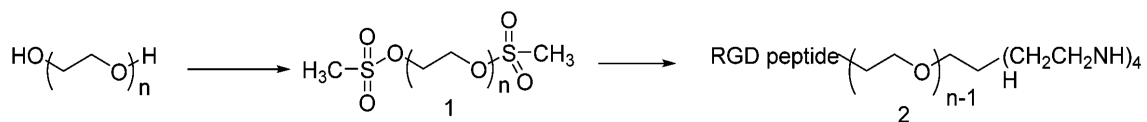
【0087】

例6：式（III）のポリマーの製造例

（1）実施例1 $\text{CH}_3\text{SO}_3 - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{SO}_2\text{CH}_3$: 1 の合成

【0088】

【化20】



20

【0089】

500 mL フラスコ中に市販の両末端に水酸基を有するポリエチレングリコール（ $\text{HO} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 、分子量10,000、Fluka）を50g、THF 200 mL、市販のブチリチウムを5 mL（1.6 M、ヘキサン溶液）、トリエチルアミン 8 mL を加えた後、メタンスルホニルクロリドを5 mL 加え、室温で、24時間反応させた。反応混合液を500 mL の冷2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離（4℃、9000 rpm、2分）後、減圧乾燥した。

得られた生成物1の ^1H NMRのスペクトルを図8に示す。

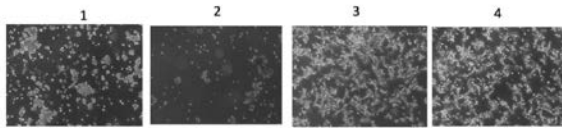
【0090】

（2） $\text{RGD} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_4\text{H}$: 2 の合成

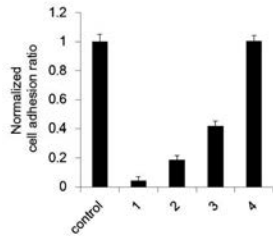
30

50 mL フラスコ中に500 mg の1、THF 10 mL、ジイソプロピルエチルアミン 1 mL、DMF 20 mL および RGD 5 mg を加え、室温で24時間反応させた。その後トリエチレンテトラミンを3 g 加えさらに24時間反応させた。反応混合液を500 mL の冷2-プロパノールに沈殿させ、遠心分離（4℃、9000 rpm、2分）後、減圧乾燥した。生成物2の ^1H NMRスペクトルを図9に示す。

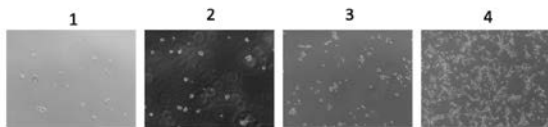
【 図 1 】



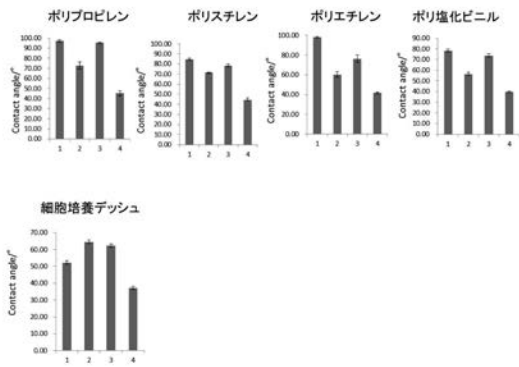
【 図 2 】



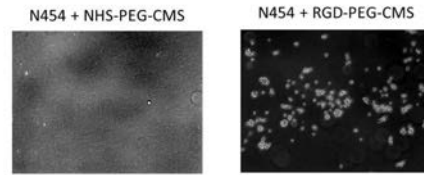
【 図 3 】



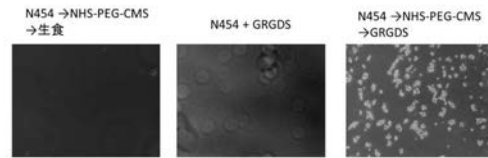
【 図 7 】



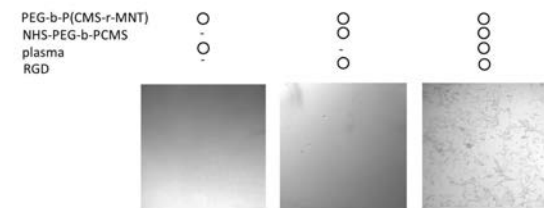
【 図 4 】



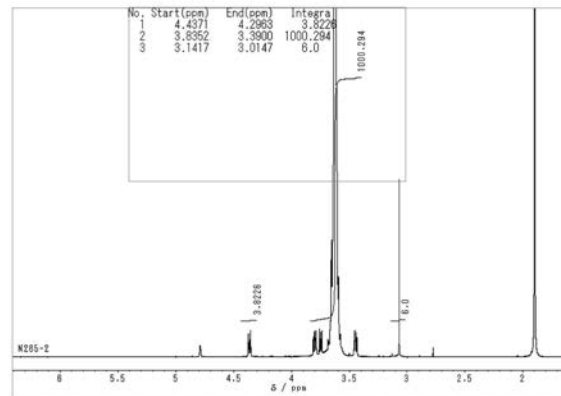
【 図 5 】



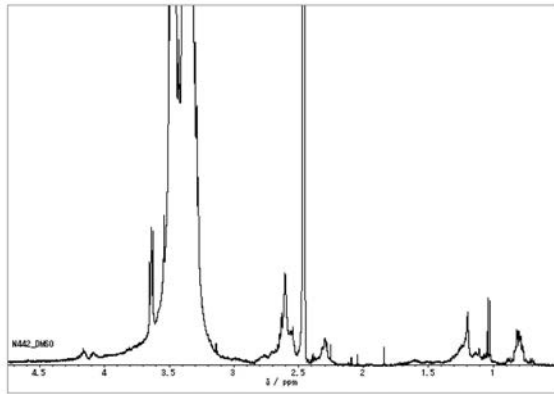
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

【要約の続き】

【選択図】なし