



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I516294 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 11 日

(21)申請案號：101121020 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61L31/10 (2006.01) C08F20/28 (2006.01)
A61M1/36 (2006.01)(30)優先權：2011/06/13 日本 2011-131241
2012/05/30 日本 2012-123228

(71)申請人：日立化成股份有限公司(日本) HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD. (JP)

日本

國立大學法人山形大學(日本) YAMAGATA UNIVERSITY (JP)

日本

(72)發明人：上原壽茂 KANBARA, HISASHIGE (JP)；田中賢 TANAKA, MASARU (JP)；八木理美 YAGI, SATOMI (JP)；干場隆志 HOSHIBA, TAKASHI (JP)；二階堂萬葉 NIKAIIDOU, MAYO (JP)；佐藤一博 SATOU, KAZUHIRO (JP)；佐藤千香子 SATOU, CHIKAKO (JP)

(74)代理人：詹銘文；葉璟宗

(56)參考文獻：

CN 101583722A

八木理美等，”血液適合性高分子表面上でのヒト癌細胞の選択的接着“，Polymer Preprints, Japan Vol. 60, No.1 (2011)，發行年：2011年5月10日，page 1884。

審查人員：湯有春

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：6 共 42 頁

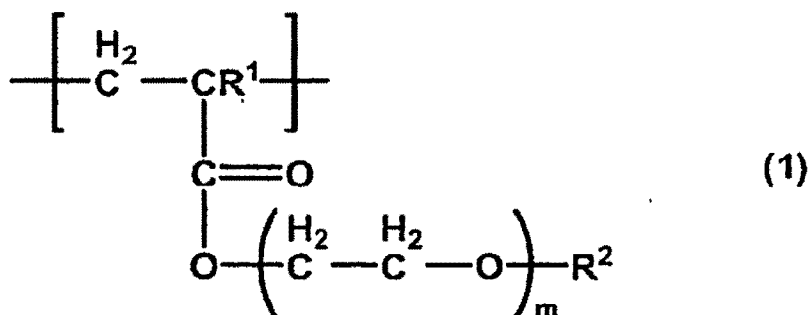
(54)名稱

癌細胞貼附性促進劑

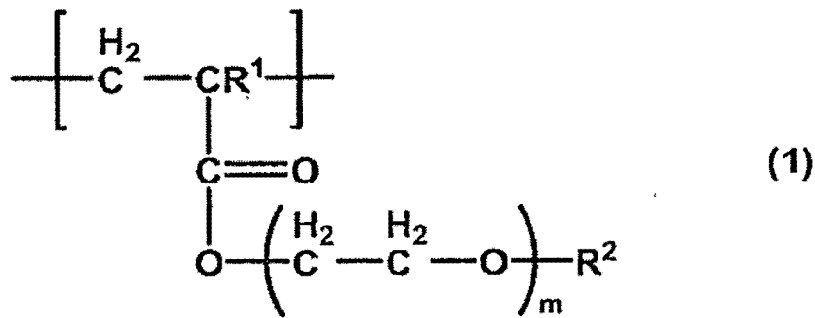
CANCER CELL ADHESIVENESS IMPROVER

(57)摘要

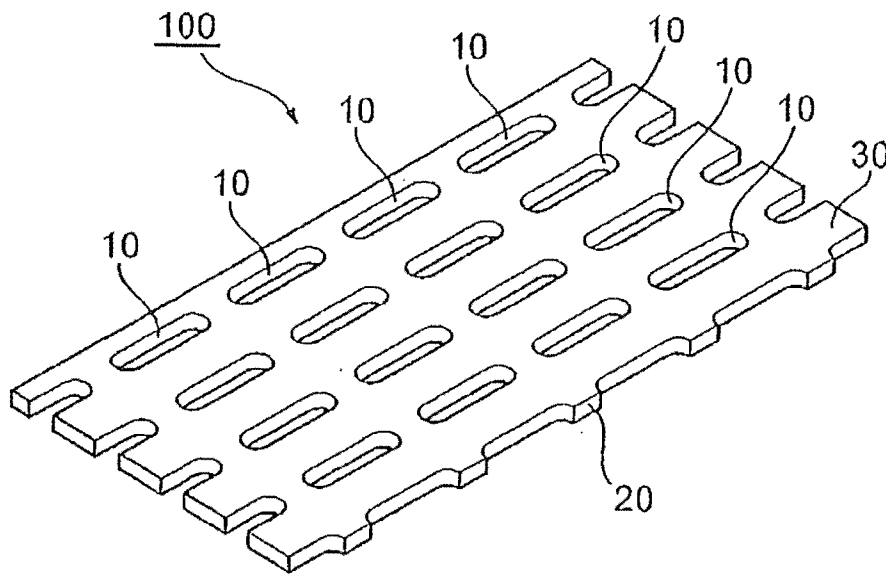
含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物藉由應用於癌細胞濃縮過濾器的表面，可提高癌細胞對過濾器表面的貼附性，提高癌細胞的濃縮率，因此有用。式中，R¹為氫原子或甲基，R²為甲基或乙基，m為1~3。



A polymer including a structural unit as shown in formula (1) is useful for enhancing the adhesiveness of cancer cells on the surface of a filter and the concentration rate of cancer cells by being applied on the surface of a cancer cell concentration filter. In the formula (1), R^1 is a hydrogen atom or a methyl, R^2 is a methyl or an ethyl, and m is 1-3.



指定代表圖：



符號簡單說明：

10 . . . 貫通孔

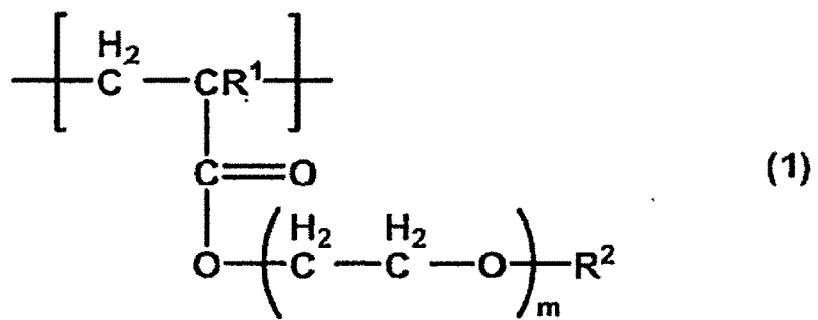
20 . . . 基板

30 . . . 面

100 . . . 過濾器

圖 1

特徵化學式：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101121020

※ 申請日期：101.6.13

※IPC 分類：

A61L 2/10 (2006.01)

C08F 20/58 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

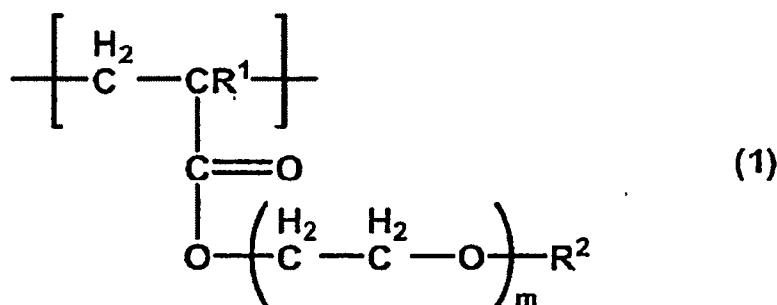
一、發明名稱：(中文/英文)

癌細胞貼附性促進劑

CANCER CELL ADHESIVENESS IMPROVER

二、中文發明摘要：

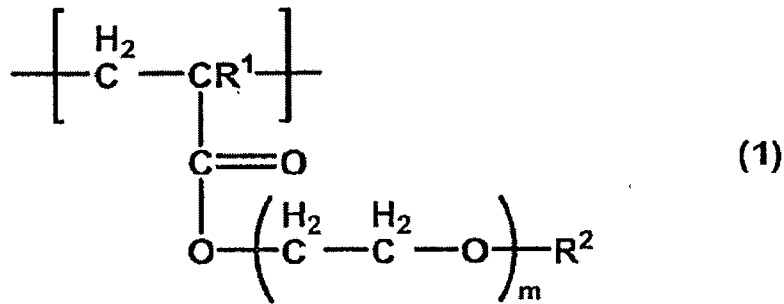
含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物藉由應用於癌細胞濃縮過濾器的表面，可提高癌細胞對過濾器表面的貼附性，提高癌細胞的濃縮率，因此有用。式中，R¹為氫原子或甲基，R²為甲基或乙基，m為1~3。



三、英文發明摘要：

A polymer including a structural unit as shown in formula (1) is useful for enhancing the adhesiveness of cancer cells on the surface of a filter and the concentration rate of cancer

cells by being applied on the surface of a cancer cell concentration filter. In the formula (1), R¹ is a hydrogen atom or a methyl, R² is a methyl or an ethyl, and m is 1-3.



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

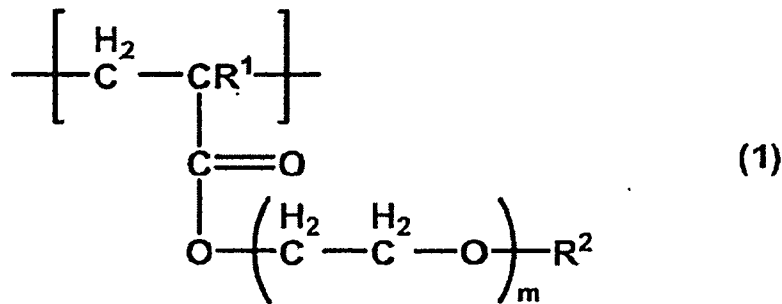
10：貫通孔

20：基板

30：面

100：過濾器

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種癌細胞貼附性促進劑。更詳細而言，本發明是有關於一種癌細胞貼附性促進劑、癌細胞濃縮過濾器及癌細胞的檢查方法。

【先前技術】

癌細胞濃縮於研究、臨床上的意義極為重大，若可將血液中的癌細胞濃縮，則可用於診斷癌症。例如，癌症的預後(Prognosis)及治療的最重要的要因在於初診時及診療時有無癌細胞的轉移。於癌細胞的初期擴散到達末梢血中的情形時，檢測血中循環癌細胞 (Circulating Tumor Cell，以下有時稱為「CTC」) 為判斷癌症的病狀發展的有用方法。

然而，對於轉移開始的普通癌症患者而言，血液中每 100 億個血球細胞中，僅存在約 1 個左右的 CTC。相對於此，血液中紅血球或白血球等血液成分壓倒性地大量存在。因此，將極低濃度的 CTC 濃縮並以高感度、高效率及高特異性進行分析非常困難。例如於藉由使用磁珠、密度梯度離心分離、微流道、流式細胞儀的方法將 CTC 濃縮的情形時，必須進行煩雜的處理，而且有時回收率差。

作為將 CTC 分離、濃縮的其他技術，提出有一種使用聚碳酸酯過濾器的方法 (例如參照非專利文獻 1 及非專利文獻 2)。另外，亦提出有一種利用尺寸的差異將 CTC 分離、濃縮的技術 (例如參照非專利文獻 3~非專利文獻 5

及專利文獻 1)。

然而已知，若血液與人工心肺等醫療用材料的表面接觸，則會產生由補體系統的活化或血小板的活化誘發的血栓形成或溶血等副作用。為了解決該問題，已報告：有效的是以預定的化合物將醫療用材料表面被覆（例如參照專利文獻 2）。

先前技術文獻

專利文獻

專利文獻 1：美國專利申請案公開第 2001/0019029 號
說明書

專利文獻 2：國際公開第 2004/087228 號

非專利文獻

非專利文獻 1：Vona G 等人 (Vona G, et al.)，「在母體血液中循環的胚胎細胞的濃縮、免疫形態及基因特性 (Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood)」，美國病理學雜誌 (Am J Pathol.) 160 (1)：51-8 (2002)

非專利文獻 2：Kahn HJ 等人 (Kahn HJ, et al.)，「過濾濃縮後的乳腺癌患者血液中的循環癌細胞的枚舉：與病期相關 (Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage)」，乳腺癌防治研究 (Breast Cancer ResTreat)；86 (3)：237-47 (2004)

非專利文獻 3：Wilding P 等人 (Wilding P, et al.)，「使用矽微濾腔的整合細胞分離及聚合酶鏈反應分析 (Integrated Cell Isolation and Polymerase Chain Reaction Analysis Using Silicon Microfilter Chambers)」，生化分析 (Anal Biochem.) 257 (2)：95-100 (1998)

非專利文獻 4：Yuen PK 等人 (Yuen PK, et al.)，「用於血液樣品製備及核酸擴增反應的微晶片模組 (Microchip module for blood sample preparation and nucleic acid amplification reactions)」，基因研究 (Genome Res.) 11 (3)：405-12 (2001)

非專利文獻 5：Mohamed H 等人 (Mohamed H, et al.)，「一種罕見的細胞分離裝置的開發：用於癌症檢測 (Development of a rare cell fractionation device：application for cancer detection.)」，IEEE 學報-奈米生物科學 (IEEE Trans Nanobioscience) 3 (4)：251-6 (2004)

CTC 等癌細胞與血液中的血球細胞例如紅血球或白血球、或者血小板等相比較，尺寸大一圈。因此，理論上可應用機械過濾法去除該些血球成分，將癌細胞濃縮。

然而，非專利文獻 1 及非專利文獻 2 的薄膜過濾器有時含有無規分布的孔，且孔徑不均勻，故癌細胞的回收率差。另外，即便是非專利文獻 3～非專利文獻 5 及專利文獻 1 的準確地控制了孔徑或厚度的過濾器，有時亦難以準確地以可分析的精度將癌細胞濃縮。

【發明內容】

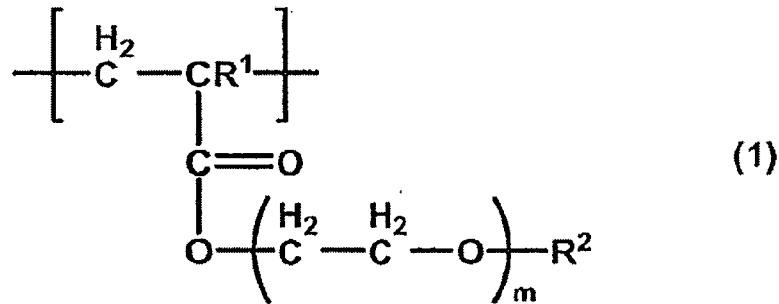
本發明是鑒於上述問題而成，其目的在於提供一種可使癌細胞的貼附性提高的癌細胞貼附性促進劑。另外，本發明的目的在於提供一種癌細胞濃縮過濾器，其是以上述癌細胞貼附性促進劑將表面被覆而成。進而，本發明的目的在於提供一種癌細胞的檢查方法，其包括以下步驟：利用上述癌細胞濃縮過濾器對末梢血進行過濾。

先前，若血液與人工心肺等醫療用材料的表面接觸，則出現以下問題：產生由補體系統的活化或血小板的活化誘發的血栓形成或溶血等副作用。而且已知，若以含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物將醫療用材料表面被覆，則即便於血液接觸的情形時，血球成分對醫療用材料表面的貼附性亦下降，抑制誘發血栓形成或溶血等副作用。將此種抑制血栓形成或溶血的性質稱為血液適性(血液適性)。

本發明者等人意外地首次發現，由含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物被覆的材料表面上，血球成分的貼附性下降，但癌細胞的貼附性提高，從而完成了本發明。

即，本發明提供一種癌細胞貼附性促進劑，其包括：含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物。

[化 1]



通式 (1) 中，R¹ 為氫原子或甲基，R² 為甲基或乙基，m 為 1~3。

上述本發明的癌細胞貼附性促進劑藉由應用於癌細胞濃縮過濾器的表面，可提高癌細胞對過濾器表面的貼附性，提高癌細胞的濃縮率。

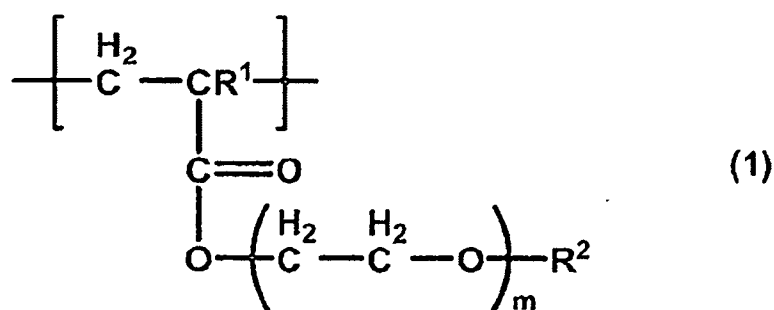
若為了提高癌細胞的濃縮率而對癌細胞濃縮過濾器的表面實施欲使細胞的貼附性提高的表面處理，則通常不僅 CTC 等癌細胞的貼附性提高，而且血球成分的貼附性亦提高。因此，結果導致癌細胞的濃縮率不提高，無法獲得所需的濃縮性能。相對於此，上述本發明的癌細胞貼附性促進劑可同時滿足血球成分的非貼附性與癌細胞的貼附性此種成取捨 (trade-off) 關係的特性。

另外，本發明提供一種使癌細胞對基板的貼附性提高的方法，其包括以下步驟：利用含有下述通式 (1) 所表示的結構單元的聚合物將基板被覆。

43010pif1

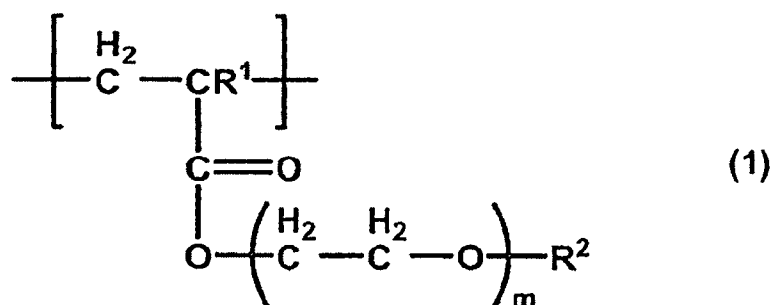
為第 101121020 號中文說明書無劃線修正本

修正日期:101 年 10 月 08 日



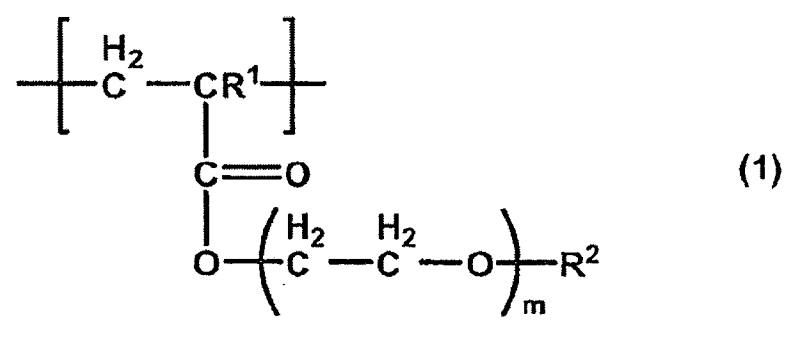
通式(1)中， R^1 為氫原子或甲基， R^2 為甲基或乙基， m 為1~3。

另外，本發明提供一種含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物的用以提高癌細胞貼附性的使用。



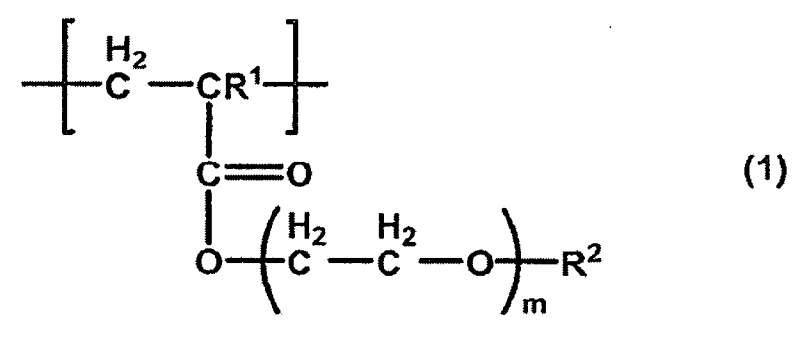
通式(1)中， R^1 為氫原子或甲基， R^2 為甲基或乙基， m 為1~3。

另外，本發明提供一種含有下述通式(1)所表示的結構單元的聚合物的用以提高癌細胞貼附性的應用。



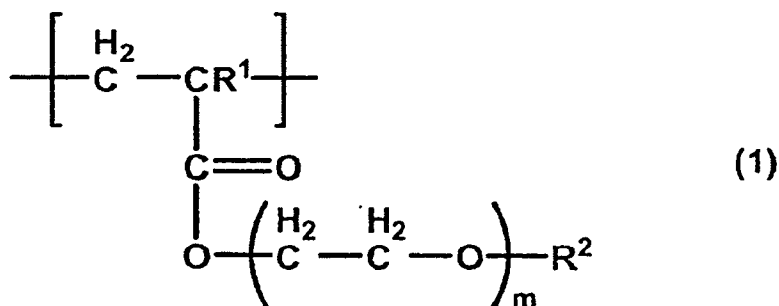
通式 (1) 中，R¹ 為氫原子或甲基，R² 為甲基或乙基，m 為 1~3。

另外，本發明提供一種含有下述通式 (1) 所表示的結構單元的聚合物的用以製造癌細胞貼附性促進劑的應用。



通式 (1) 中，R¹ 為氫原子或甲基，R² 為甲基或乙基，m 為 1~3。

另外，本發明提供一種癌細胞濃縮過濾器，其包含形成有多個貫通孔的基板，且基板的至少一部分是由含有下述通式 (1) 所表示的結構單元的聚合物所被覆。



通式(1)中， R^1 為氫原子或甲基， R^2 為甲基或乙基， m 為1~3。

上述聚合物亦可包含上述通式(1)所表示的結構單元。另外，較佳為 R^1 為氫原子、 R^2 為甲基、 m 為1。另外，亦可 R^1 為氫原子、 R^2 為乙基， m 為2，亦可 R^1 為甲基、 R^2 為甲基、 m 為2。另外，上述聚合物較佳為數量平均分子量為10,000~300,000。

此種聚合物可進一步提高癌細胞的貼附性。

另外，本發明提供一種癌細胞濃縮過濾器，其包括：形成有多個貫通孔的基板，且該基板的至少一部分是由上述聚合物所被覆。

根據上述本發明的癌細胞濃縮過濾器，可將血液樣品中的癌細胞以高的濃縮率濃縮。

上述貫通孔較佳為平均孔徑為5 μm 以上、小於30 μm ，且平均開口率為5%以上、小於50%，較佳為藉由電氣鑄造法而形成。另外，上述基板較佳為包含金屬。進而，上述金屬較佳為選自由銅、鎳、銅與鎳的合金以及該些金屬的表面經鍍金而成者所組成的組群中。

根據此種癌細胞濃縮過濾器，可將血液樣品中的癌細

胞以更高的濃縮率濃縮。

另外，本發明提供一種檢測癌細胞的存在的方法，其包括過濾步驟：利用上述癌細胞濃縮過濾器對末梢血進行過濾。

根據上述本發明的方法，可容易地檢測自患者所採取的末梢血中的 CTC 等癌細胞的存在。

上述檢查方法亦可更包括對上述過濾步驟中經濃縮的細胞的基因進行分析的步驟，亦可更包括對上述過濾步驟中經濃縮的細胞進行培養的步驟。

上述過濾步驟由於對細胞的損傷小，故可進行以下步驟：對經濃縮的細胞的基因進行分析的步驟、或對細胞進行培養的步驟。本發明的檢測癌細胞的存在的方法藉由進一步含有該些步驟，可更準確地檢測末梢血中的 CTC 等癌細胞的存在。

[發明的效果]

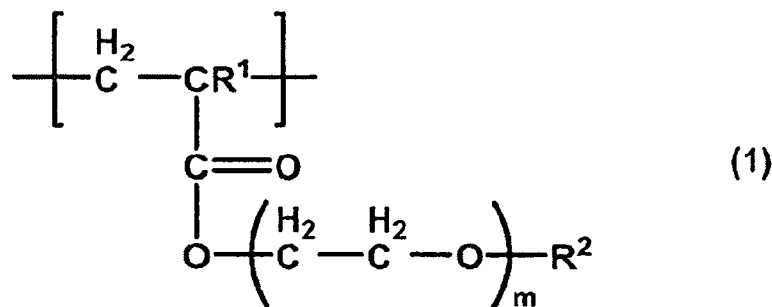
根據本發明，提供一種癌細胞貼附性促進劑、癌細胞濃縮過濾器及癌細胞的檢查方法，上述癌細胞濃縮過濾器是以癌細胞貼附性促進劑將表面被覆而成，上述癌細胞的檢查方法包括利用該癌細胞濃縮過濾器對末梢血進行過濾的步驟。

【實施方式】

以下，視情形一面參照圖式一面對合適的實施形態加以說明。再者，於圖式的說明中，對相同要素標註相同符號，省略重複說明。另外，圖式中為了容易理解而將一部

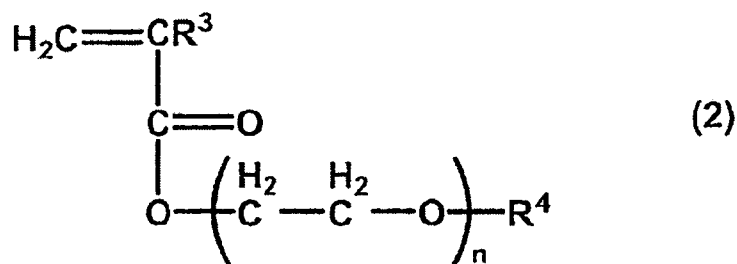
分誇張描繪，尺寸比率未必與說明中者一致。

於一實施形態中，癌細胞貼附性促進劑包含含有下述通式 (1) 所表示的結構單元的聚合物。



上述通式 (1) 中， R^1 為氫原子或甲基， R^2 為甲基或乙基， m 為 1~3。上述聚合物的數量平均分子量較佳為 10,000~300,000。於數量平均分子量為 10,000 以下的情形時，有時上述聚合物成為液狀，操作變困難。另外，有時難以藉由通常的自由基聚合使上述聚合物的數量平均分子量為 300,000 以上。

上述聚合物典型而言可藉由以下方式製造：於下述通式 (2) 所表示的單體的溶液中添加適當的起始劑，藉由通常的方法進行聚合。進行聚合反應的溫度較佳為 40°C~100°C，更佳為 60°C~90°C，進而佳為 70°C~80°C。進行聚合反應的壓力較佳為常壓。



上述通式 (2) 中， R^3 為氫原子或甲基， R^4 為甲基或乙基， n 為 1~3。

於聚合反應中，溶劑可使用能將上述通式 (2) 所表示的單體溶解的溶劑。例如為脂肪族或芳香族的有機溶劑，更具體可列舉：二氧陸園(dioxane)、四氫呋喃、二乙醚等醚系溶劑；鄰二氯苯等鹵化芳香族烴；N,N-二甲基甲醯胺等醯胺；二甲基亞砷等亞砷；苯、甲苯等芳香族烴；己烷、戊烷等脂肪族烴；較佳為二氧陸園等醚系溶劑。

於一實施形態中，癌細胞貼附性促進劑包含由上述通式 (1) 所表示的結構單元構成的聚合物。

癌細胞貼附性促進劑較佳為上述通式 (1) 中的 R^1 、 R^2 及 m 為以下 (a) ~ (h) 的任一組合。

- (a) R^1 為氫原子， R^2 為甲基， m 為 1~2。
- (b) R^1 為氫原子， R^2 為甲基， m 為 3。
- (c) R^1 為氫原子， R^2 為乙基， m 為 1~2。
- (d) R^1 為氫原子， R^2 為乙基， m 為 3。
- (e) R^1 為甲基， R^2 為甲基， m 為 1~2。
- (f) R^1 為甲基， R^2 為甲基， m 為 3。
- (g) R^1 為甲基， R^2 為乙基， m 為 1~2。
- (h) R^1 為甲基， R^2 為乙基， m 為 3。

藉由 R^1 、 R^2 及 m 為上述組合，可進一步提高以下效果：降低血球成分對由癌細胞貼附性促進劑被覆的基板的貼附性，並且提高癌細胞的貼附性。

於一實施形態中，癌細胞貼附性促進劑為上述通式(2)所表示的單體與其他可聚合的單體的無規共聚物或嵌段共聚物或接枝共聚物。

可與上述通式(2)所表示的單體聚合的單體可列舉：丙烯醯胺、第三丁基丙烯醯胺、正丁基丙烯醯胺、異丁基丙烯醯胺、己基丙烯醯胺、庚基丙烯醯胺等烷基丙烯醯胺；N,N-二甲基丙烯醯胺、N,N-二乙基丙烯醯胺等 N,N-二烷基丙烯醯胺；丙烯酸胺基甲酯、丙烯酸胺基乙酯、丙烯酸胺基異丙酯等丙烯酸胺基烷酯；丙烯酸二胺基甲酯、丙烯酸二胺基乙酯、丙烯酸二胺基丁酯等丙烯酸二胺基烷酯；甲基丙烯醯胺、N,N-二甲基甲基丙烯醯胺、N,N-二乙基甲基丙烯醯胺等 N,N-二烷基甲基丙烯醯胺；甲基丙烯酸胺基甲酯、甲基丙烯酸胺基乙酯等甲基丙烯酸胺基烷酯；甲基丙烯酸二胺基甲酯、甲基丙烯酸二胺基乙酯等甲基丙烯酸二胺基烷酯；丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸異丙酯、丙烯酸丁酯、丙烯酸己酯、丙烯酸-2-乙基己酯等丙烯酸烷酯；甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸己酯等甲基丙烯酸烷酯；(甲基)丙烯酸甲氧基酯等(甲基)丙烯酸烷氧基酯；(甲基)丙烯酸甲氧基乙酯等(甲基)丙烯酸烷氧基烷酯；甲基丙烯酸環氧丙酯；丙烯等。

與上述通式(2)所表示的單體聚合的單體亦可為選自

由丙烯酸烷酯、甲基丙烯酸烷酯、(甲基)丙烯酸烷氧基酯、(甲基)丙烯酸烷氧基烷酯、甲基丙烯酸環氧丙酯及丙烯所組成的組群中的一種以上的單體。

上述通式(2)所表示的單體及上述可聚合的單體的共聚物可為無規共聚物、嵌段共聚物、接枝共聚物的任一種，可藉由無規聚合、離子聚合、利用大分子單體的聚合等方法來製造。

於使上述通式(2)所表示的單體與上述可聚合的單體進行共聚合的情形時，上述通式(2)所表示的單體較佳為共聚物中的 30 質量%~99 質量%，更佳為 50 質量%~99 質量%。

含有上述通式(1)所表示的結構單元的聚合物典型而言可藉由以下方式製造：於上述通式(2)所表示的單體的溶液中添加適當的起始劑、及視情形而添加上述可聚合的一種以上的單體，藉由無規聚合、離子聚合、光聚合、利用大分子單體的聚合等方法進行聚合。進行聚合反應的溫度較佳為 40°C~100°C，更佳為 60°C~90°C，進而佳為 70°C~80°C。進行聚合反應的壓力較佳為常壓。

於聚合反應中，溶劑可使用能將上述通式(2)所表示的單體及上述可聚合的單體溶解的溶劑。此種溶劑例如為脂肪族或芳香族的有機溶劑，更具體可列舉：二氧陸園、四氫呋喃、二乙醚等醚系溶劑；鄰二氯苯等鹵化芳香族烴；N,N-二甲基甲醯胺等醯胺；二甲基亞砷等亞砷；苯、甲苯等芳香族烴；己烷、戊烷等脂肪族烴；較佳為二氧陸園等

醚系溶劑。

若將癌細胞貼附性促進劑應用於癌細胞濃縮過濾器等的基板的表面，則賦予血液適性，故可於血液的接觸時抑制血液成分的活化，可減少血球成分對過濾器的附著。另外，應用癌細胞貼附性促進劑的癌細胞濃縮過濾器對各種癌細胞的貼附性良好，故可使癌細胞高效地濃縮。

含有上述通式(1)所表示的結構單元的聚合物於分子內具有作為極性基的醚鍵及酯鍵，但該些極性基與氮原子(胺基、亞胺基)或羧基等不同，不具有與有機體成分的強的靜電相互作用。另外，由於不具有大的疏水性基，故疏水性相互作用亦小。因此可推測，含有上述通式(1)所表示的結構單元的聚合物對血液的活性低，表現出優異的血液適性。

於醫療用材料表面與有機體內組織或血液中的蛋白質接觸時，較佳為不引起蛋白質的吸附改質或活化，因此可認為，有用的是減小作用於物質間的大的相互作用即疏水性相互作用或靜電相互作用。就此方面而言，應用癌細胞貼附性促進劑的表面可具備合適的表面結構。

另外，應用癌細胞貼附性促進劑的表面具有適度的親水性，故即便於與血液接觸的情形時，血小板的貼附亦輕微，表現出優良的血液適性。另外可認為，由來源於羥基的氫鍵所導致的與有機體成分的相互作用或吸附蛋白質的改質等亦得到抑制。

藉由將癌細胞貼附性促進劑應用於癌細胞濃縮過濾器

等的基板的表面，可減輕紅血球、白血球、血小板等血球成分對過濾器的貼附，同時選擇性地高效捕獲癌細胞。關於該功能的表現機制，並未詳細闡明，但發明者等人推測可藉由中間水的概念來說明。

即，與應用癌細胞貼附性促進劑的基板接觸的水中，一般認為存在以下的水：(1) 與癌細胞貼附性促進劑的相互作用弱，於 0°C 下融化的自由水；(2) 與癌細胞貼附性促進劑的相互作用強，於 -100°C 下亦不凍結的不凍水；及 (3) 相互作用為自由水與不凍水的中間程度，於較 0°C 低的溫度下凍結的中間水。一般認為，正常的血球細胞具有與癌細胞貼附性促進劑接觸的不凍水、中間水、自由水等及水合殼，藉由該水合結構而變穩定，但藉由中間水將強烈反映出癌細胞貼附性促進劑的結構的不凍水掩蓋 (camouflage)，抑制對基板表面的貼附。另一方面，癌細胞由於細胞表面的糖鏈的表現與正常細胞不同，故與正常的血球細胞相比較，水合結構被擾亂。一般認為，藉此將基板表面的中間水的結構擾亂，對基板表面的貼附性提高。

癌細胞貼附性促進劑可應用於所有種類的癌細胞，較佳為應用於容易引起對血管的浸潤的來源於上皮性細胞的癌，其中亦特佳為應用於被認為 CTC 多的肺癌、大腸癌或胃癌或食道癌等消化器官癌、乳腺癌、前列腺癌。

於一實施形態中，本發明提供一種癌細胞濃縮過濾器，其包含形成有多個貫通孔的基板，且該基板的至少一部分是由癌細胞貼附性促進劑所被覆。該過濾器可將血液

中的 CTC 等癌細胞濃縮。貫通孔的開口形狀可例示圓、橢圓、長方形、圓角長方形、多邊形等。所謂圓角長方形，是指包含 2 條長度相等的長邊與 2 個半圓形的形狀。就高效捕獲癌細胞的觀點而言，較佳為圓、長方形或圓角長方形。另外，就防止過濾器的堵塞的觀點而言，特佳為圓角長方形。

圖 1 為表示癌細胞濃縮過濾器的一實施形態的概略圖。過濾器 100 包含形成有多個貫通孔 10 的基板 20。貫通孔 10 的開口形狀為圓角長方形。於基板 20 的面 30 的表面上捕獲 CTC。至少面 30 的一部分是由癌細胞貼附性促進劑所被覆。癌細胞貼附性促進劑較佳為將面 30 整體被覆。與面 30 為相反側的一面的一部分或整體亦可由癌細胞貼附性促進劑被覆。

將癌細胞貼附性促進劑應用於癌細胞濃縮過濾器等的基板的表面的方法最普通的是被覆。被覆是藉由以下方式進行：藉由浸漬法、噴霧法、旋塗法等使含有上述通式(1)所表示的結構單元的聚合物的溶液附著於基板表面後，將溶劑去除(乾燥)。乾燥後的膜厚較佳為 $0.01\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \text{mm}$ ，更佳為 $0.1\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ ，進而佳為 $0.5\ \mu\text{m}\sim 50\ \mu\text{m}$ 。若膜厚小於 $0.01\ \mu\text{m}$ ，則有時未充分表現出與血球成分的非貼附性或與癌細胞的貼附性。另外，若膜厚超過 $1.0\ \text{mm}$ ，則有時該些貼附特性的平衡被破壞。

為了將癌細胞貼附性促進劑更牢固地固定於基板，亦可於被覆癌細胞貼附性促進劑後，對基板進行加熱。另外，

亦可使包含上述通式(1)所表示的結構單元的聚合物進行交聯。交聯的方法可例示：預先於聚合物的材料中添加交聯性單體。交聯時亦可使用電子束、 γ 射線、光照射。

於藉由電漿接枝聚合在基板的表面上形成含有上述通式(1)所表示的結構單元的聚合物的層時，只要進行以下操作即可：於約 1.3×10^{-1} Pa、較佳為 1.3 Pa~133.3 Pa 的減壓下，於氫氣、氮氣、空氣各種單體等的環境下，以 1 秒鐘~300 秒鐘、較佳為 2 秒鐘~30 秒鐘照射低溫電漿後，供給上述通式(2)所表示的單體進行電漿起始聚合。

於一實施形態中，基板的材質或形狀並無特別限制，例如可使用多孔質體、纖維、不織布、膜、片材、管。基板的材質可列舉：木棉、麻等天然高分子；尼龍、聚酯、聚丙烯腈、聚烯烴、鹵化聚烯烴、聚胺基甲酸酯、聚醯胺、聚砜、聚醚砜、聚(甲基)丙烯酸酯、鹵化聚烯烴乙烯-聚乙烯醇共聚物、丁二烯-丙烯腈共聚物等合成高分子或該些高分子等的混合物。另外，亦可例示金屬、陶瓷及該些材料的複合材料等，亦可包含多個基板。

金屬可例示：金、銀等貴金屬；銅、鋁、鎢、鎳、鉻等賤金屬；及該些金屬的合金；但不限定於該些金屬。金屬能以單體的形式使用，亦能以與其他金屬的合金或金屬的氧化物的形式使用以賦予功能性。就價格或獲取容易性的觀點而言，較佳為使用鎳、銅及以該些金屬作為主成分的金屬。此處，所謂主成分，是指於形成上述基板的材料中占 50 重量%以上的成分。亦可對該些金屬使用光微影等

方法形成貫通孔而製成網式過濾器 (screen filter)。

通常 CTC 的大小為直徑 10 μm 以上。此處，所謂細胞的直徑，其是指利用顯微鏡觀察時，將細胞輪廓上的任意 2 點連結的直線中最長的直線的長度。就血液的透過性及 CTC 的捕捉性能的觀點而言，癌細胞濃縮過濾器較佳為貫通孔的平均孔徑為 5 μm 以上、小於 30 μm ，且平均開口率為 5% 以上、小於 50%。另外，更佳為平均孔徑為 5 μm 以上、小於 15 μm ，且平均開口率為 10% 以上、小於 40%，特佳為平均孔徑為 5 μm 以上、小於 10 μm ，且平均開口率為 20% 以上、小於 40%。此處，所謂開口率是指貫通孔在過濾器整體的面積中所占的面積。就防止堵塞的觀點而言，平均開口率越大越佳，但若超過上述上限值，則有時過濾器的強度下降，或加工變困難。另外，若小於 5%，則有時過濾器的癌細胞濃縮性能下降。

於本說明書中，所謂開口形狀為橢圓、長方形、多邊形等圓以外的形狀的孔徑，其是指可通過各貫通孔的球的直徑的最大值。例如於開口形狀為長方形的情形時，貫通孔的孔徑成為該長方形的短邊的長度，於開口形狀為多邊形的情形時，貫通孔的孔徑成為該多邊形的內接圓的直徑。即便於開口形狀為長方形或圓角長方形、且 CTC 或白血球被貫通孔捕捉的情形時，於開口部中於開口形狀的長邊方向上亦出現間隙。通過該間隙而液體可通過，故可防止過濾器的堵塞。

過濾器的基板的厚度較佳為 3 μm ~100 μm ，更佳為 5

$\mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ ，特佳為 $10 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ 。若基板的厚度薄於 $3 \mu\text{m}$ ，則有時過濾器的強度下降，操作變困難。另外，若基板的厚度超過 $100 \mu\text{m}$ ，則有時消耗必要以上的材料，或加工耗費長時間，故於成本方面不利，或精密加工本身變困難。

繼而，對本實施形態的癌細胞濃縮過濾器的製造方法加以說明。本實施形態的過濾器的製造方法並無特別限制，例如是藉由電氣鑄造法（電鑄法）而形成。所謂電氣鑄造法是指於母模上實施厚的電鍍後加以剝離的方法。首先，於包含不鏽鋼等的支撐體上貼合感光性的抗蝕劑膜（感光層）。繼而，將具有過濾器的貫通孔的開口形狀的圖案的遮罩固定於感光層上。然後，自遮罩上照射光（活性光線）。於光照射後，於在感光層上具有支撐體的情形時將其去除，藉由利用鹼性水溶液、水系顯影液及有機溶劑等顯影液的濕式顯影、或乾式顯影等將未曝光部去除，藉此進行顯影，形成抗蝕劑圖案。繼而，將經顯影的抗蝕劑圖案作為遮罩，於未被遮蔽而露出的基板上進行鍍敷。鍍敷的方法例如可列舉鍍銅、鍍焊錫、鍍鎳、鍍金等。鍍敷處理後，若將鍍敷層自支撐體及感光層剝離，則獲得鍍敷層。藉由上述方法，以癌細胞貼附性促進劑將該鍍敷層的至少一部分被覆，藉此獲得癌細胞濃縮過濾器。

於一實施形態中，本發明提供一種檢測癌細胞的存在的方法，其包括過濾步驟，該過濾步驟利用上述癌細胞濃縮過濾器對試樣進行過濾。將 CTC 等癌細胞濃縮的試樣亦

43010pif1

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正本

修正日期:101 年 10 月 08 日

可利用鬱積 (pool) 於骨髓、脾臟、肝臟等中的血液、淋巴、組織液、臍帶血等，最簡便的是使用於體內循環的末梢血。檢測末梢血中的 CTC 的存在為判斷癌症的病狀發展的有用手段。

本實施形態的檢測癌細胞的存在的方法例如可藉由以下方式實施：將上述癌細胞濃縮過濾器組入至流道內，於流道中導入末梢血，藉此將含有 CTC 的細胞濃縮，確認經濃縮的細胞中是否存在 CTC。於流道中的血液的導入可例示以下方法：使用自流道的入口方向的加壓的方法、使用自流道的出口方向的減壓的方法、使用蠕動泵 (peristaltic pump) 的方法等。另外，關於所使用的過濾器的面積，例如於自 1 mL 血液濃縮 CTC 的情形時，合適的是 $1\text{ cm}^2 \sim 10\text{ cm}^2$ 。

於利用上述方法將 CTC 濃縮的情形時，不僅 CTC 被濃縮而且白血球等血球細胞亦同時被濃縮。因此，必須確認所回收的細胞是否含有癌細胞。例如，可利用上述方法將 CTC 濃縮後，利用對經螢光標記的癌標記物的抗體進行染色，確認為癌細胞。對癌標記物的抗體可例示抗 EpCAM 抗體等。

另外，亦可對經上述方法濃縮的細胞的基因進行分析，藉此確認為癌細胞。例如，可對 p53、K-RAS、H-RAS、N-RAS、BRAF、APC 等基因的突變進行分析，確認為癌細胞。另外，該些基因分析的結果亦可用於決定此後的患者的治療方針等。或者亦可藉由對經上述方法濃縮的細胞

的端粒酶 (telomerase) 活性等進行測定，而確認為癌細胞。

上述過濾步驟對細胞的損傷小，故亦可對經濃縮的細胞進行培養，進一步進行詳細分析。

實例

以下，根據實例對本發明加以說明。然而，本發明不限制於下述實例。

(實驗例 I-1)

(聚丙烯酸甲氧基乙酯的合成)

合成上述通式 (1) 中 R^1 為氫、 R^2 為甲基、 m 為 1 的聚丙烯酸甲氧基乙酯。具體而言，於 1,4-二氧陸園 60 g 中，將偶氮雙異丁腈 (0.1 質量%) 作為起始劑，一面進行氮氣通氣 (bubbling) 一面於 75°C 下將丙烯酸甲氧基乙酯 15 g 進行 10 小時聚合。聚合反應結束後，滴加於正己烷中使其沈澱，分離產物。將產物溶解於四氫呋喃中，進而使用正己烷進行 2 次純化，減壓乾燥一晝夜。獲得無色透明且為高黏度的聚合物。產率為 76%。藉由凝膠滲透層析儀 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 對所得的聚合物進行分析，結果數量平均分子量為 15,000，分子量分布 (Mw/Mn) 為 3.4。

聚合物的分子量是於下述 GPC 的測定條件以標準聚苯乙烯換算分子量計算。

泵：PU Intelligent HPLC Pump (Jasco 製造)

管柱：GPC K804 (昭和電工製造，Shodex)

溶離液：氯仿

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正頁

修正日期:104 年 9 月 17 日

測定溫度：室溫

流量：1.0 mL/min

檢測器：Jasco RI-1530 型 RI (Jasco 製造)

(實驗例 I-2)

(鎳基板的製作)

於市售的鈦板上，將鈦板作為陰極而浸漬於電解鍍鎳用的電解浴（胺基磺酸鎳為 450 g/L、氯化鎳為 5 g/L、硼酸為 30 g/L 的水溶液，55°C）中，將陽極浸漬於該電解浴中。對兩極施加電壓而以厚度成為 10 μm 的方式進行鍍鎳，製作鎳基板。

(實驗例 I-3)

(鎳基板的被覆及確認)

將實驗例 I-1 中合成的聚合物溶解於氯仿中，以 0 質量%~5 質量%的範圍獲得濃度不同的多種聚合物溶液。將各聚合物溶液塗佈（澆鑄）於實驗例 I-2 中製作的鎳基板上，使溶劑乾燥，將鎳基板的表面被覆。製作進行 1 次聚合物的塗佈的基板、及進行 2 次聚合物的塗佈的基板。使用於聚對苯二甲酸乙二酯基板上塗佈有 40 μL 的聚合物溶液而成者作為陽性對照組。於該些基板上測定水的接觸角，確認到由聚合物所被覆。接觸角的測定時使用接觸角測定裝置（埃爾默 (Elmer)，MODEL G-1-100)。將純水 2 μl 滴加於各基板的表面上，測定 30 秒後的靜態接觸角。圖 2 為表示實驗例 I-3 的結果的圖表。橫軸表示聚合物的濃度，縱軸表示水的接觸角。圖 2 中，A 為塗佈 1 次聚合

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正頁

修正日期:104 年 9 月 17 日

物溶液的結果，B 為塗佈 2 次聚合物溶液的結果，C 為陽性對照組。

(實驗例 I-4)

(基板的準備)

將實驗例 I-1 中合成的聚合物溶解於氯仿中，獲得 4 質量%溶液。將該溶液塗佈於實驗例 I-2 中製作的鎳基板上，使溶劑乾燥，以聚合物將鎳基板的表面被覆，製作實例 I-1 的鎳基板。聚合物溶液的塗佈是進行 2 次。根據 X 射線光電子分光儀 (島津製作所, ESCA-1000)，未觀測到來源於鎳基板的鎳的波峰，且檢測到來源於聚合物的碳及氧的波峰，故確認到鎳基板是由聚合物所被覆。另外，使用實驗例 I-2 中製作的鎳基板作為比較例 I-1 的鎳基板。

(癌細胞的貼附性試驗)

於實例 I-1 及比較例 I-1 的鎳基板上，利用移液管滴加藉由添加有 10% 的血清的培養基調整為 10,000 個/mL 的癌細胞懸浮液 1.0 mL，於 37°C 下靜置 60 分鐘。使用人纖維肉瘤細胞株 HT-1080 作為癌細胞。繼而，使用生理緩衝食鹽水淋洗，對貼附於基板的細胞的個數進行計數。為了使計數容易，利用甲醛將細胞固定後，利用 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-diamino-2-phenylindole, DAPI) 將細胞核染色。使用共焦雷射顯微鏡 (Olympus FV-1000) 對細胞核的個數進行計數，作為細胞的個數。

圖 3 為表示實驗例 I-4 的結果的圖表。實驗是各進行 5 次，並以平均值±標準偏差來表示結果。實例 I-1 的鎳基板

與比較例 I-1 的鎳基板相比較，貼附的癌細胞數增多。即便於多數的其他癌細胞的情況下，亦確認到相同的結果。

(實驗例 I-5)

(基板的準備)

與實驗例 I-4 同樣地使用實例 I-1 及比較例 I-1 的鎳基板進行實驗。

(血小板的貼附性試驗)

於實例 I-1 及比較例 I-1 的鎳基板上，利用移液管滴加藉由檸檬酸鈉進行抗凝固的人新鮮多血小板血漿 0.2 mL，於 37°C 下靜置 60 分鐘。繼而利用磷酸緩衝溶液淋洗，利用戊二醛加以固定後，利用掃描式電子顯微鏡觀察基板，對貼附於 $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 的面積的血小板數進行計數。

圖 4 為表示實驗例 I-5 的結果的圖表。實驗是各進行 5 次，以平均值 \pm 標準偏差來表示結果。結果顯示，實例 I-1 的鎳基板與比較例 I-1 的鎳基板相比較，貼附的血小板數較少。

由實驗例 I-4 及實驗例 I-5 的結果表明，實例 I-1 的鎳基板雖然癌細胞的貼附性提高，但血球成分的貼附性小。因此，本發明的癌細胞貼附性促進劑藉由應用於癌細胞濃縮過濾器的表面，可提高癌細胞對過濾器的貼附性，提高癌細胞的濃縮率。

(實驗例 II-1)

(聚[丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]的合成)

合成上述通式 (1) 中 R^1 為氫、 R^2 為乙基、 m 為 2 的

聚[丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]。具體而言，於 1,4-二氧陸園 60 g 中，將偶氮雙異丁腈 (0.1 質量%) 作為起始劑，一面進行氮氣通氣一面於 75°C 下將丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯 15 g 進行 10 小時聚合。聚合反應結束後，滴加至正己烷中使其沈澱，分離產物。將產物溶解於四氫呋喃中，進而使用正己烷進行 2 次純化。將純化物減壓乾燥一晝夜。獲得無色透明且為澱粉糖漿狀的聚合物。產量 (產率) 為 11.4 g (76.0%)。藉由 $^1\text{H-NMR}$ 對所得的聚合物結構進行確認。GPC 的分子量分析的結果為，數量平均分子量 (Mn) 為 12,000，分子量分布 (Mw/Mn) 為 3.9。聚合物的分子量是於與實驗例 I-1 相同的 GPC 的測定條件下以標準聚苯乙烯換算分子量計算。

(聚[甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯]的合成)

合成上述通式 (1) 中 R^1 為甲基、 R^2 為甲基、 m 為 2 的聚[甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯]。具體而言，於 1,4-二氧陸園 50 g 中，將偶氮雙異丁腈 (0.1 質量%) 作為起始劑，一面進行氮氣通氣，一面於 80°C 下將甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯 10 g 聚合 8 小時。聚合反應結束後，滴加至正己烷中使其沈澱，分離產物。將產物溶解於四氫呋喃中，進而使用正己烷進行 2 次純化。將純化物減壓乾燥一晝夜。獲得無色透明且為澱粉糖漿狀的聚合物。產量 (產率) 為 8.2 g (82.0%)。藉由 $^1\text{H-NMR}$ 確認所得的聚合物結構。GPC 的分子量分析的結果為，數量平均分子量 (Mn) 為 104,000，分子量分布 (Mw/Mn) 為 4.6。聚

43010pifl

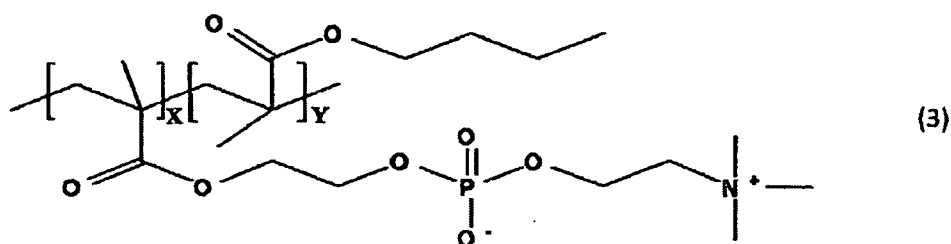
為第 101121020 號中文說明書無劃線修正本

修正日期:101 年 10 月 08 日

合物的分子量是於與實驗例 I-1 相同的 GPC 的測定條件下以標準聚苯乙烯換算分子量計算。

(聚(2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼-共-甲基丙烯酸丁酯)的合成)

合成下述通式 (3) 所表示的聚(2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼-共-甲基丙烯酸丁酯)。聚(2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼-共-甲基丙烯酸丁酯)為2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼 (MPC) 與甲基丙烯酸丁酯 (BMA) 的共聚物，MPC : BMA=40 mol% : 60 mol%~1 mol% : 99 mol%。



上述通式 (3) 中，X 及 Y 為 1~10,000，X : Y 為 40 mol% : 60 mol%~1 mol% : 99 mol%。

具體而言，將單體溶解於乙醇中，將偶氮雙異丁腈(0.1 質量%) 作為起始劑，一面進行氮氣通氣一面於 75°C 下進行 10 小時聚合。聚合反應結束後，滴加至二乙醚中使其沈澱，分離產物。將產物溶解於乙醇中，進而使用二乙醚進行 2 次純化，減壓乾燥一晝夜。獲得白色粉末狀的聚合物。產率為 51%。藉由凝膠滲透層析儀 (GPC) 對所得的聚合物進行分析，結果數量平均分子量為 240,000，分子量分布 (Mw/Mn) 為 2.9。關於聚合物的分子量，除了使溶離

液為乙醇/氯仿 (2/8) 以外，於與實驗例 I-1 相同的 GPC 的測定條件下以標準聚氧乙烯換算分子量計算。

(實驗例 II-2)

(鎳基板的製作)

進行與實驗例 I-2 相同的處理而製作鎳基板。

(實驗例 II-3)

進行與(實驗例 I-3)相同的處理而於鎳基板上被覆聚合物，測定此時的水的靜態接觸角。其結果為，聚[丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]為 0.2 wt/vol% 以上，且接觸角大致穩定為 25°。另外，聚[甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯]為 0.5 wt/vol% 以上，且接觸角大致穩定為 38°。另外，聚(2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼-共-甲基丙烯酸丁酯)為 0.1 wt/vol% 以上，且接觸角大致穩定為 104°。

(實驗例 II-4)

(基板的準備)

將實驗例 I-1 及實驗例 II-1 中合成的 4 種聚合物分別溶解於氯仿中，獲得 4 質量% 溶液。將該些溶液塗佈於實驗例 II-2 中製作的鎳基板上，使溶劑乾燥，以聚合物將鎳基板的表面被覆，分別製作實例 II-1 (聚丙烯酸甲氧基乙酯)、實例 II-2 (聚[丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯])、實例 II-3 (聚[甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯]) 及比較例 II-1 (聚(2-甲基丙烯醯氧基乙基磷酸膽鹼-共-甲基丙烯酸丁酯)) 的鎳基板。聚合物溶液的塗佈是進行 2 次。根據 X 射線光電子分光儀 (島津製作所，ESCA-1000)，未觀測

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正頁

修正日期:104 年 9 月 17 日

到來源於鎳基板的鎳的波峰，且檢測到來源於聚合物的碳及氧的波峰，故確認到鎳基板是由聚合物所被覆。

(癌細胞的貼附性試驗)

於實例 II-1~實例 II-3 及比較例 II-1 的鎳基板上，利用移液管滴加藉由添加有 10% 的血清的培養基調整為 10,000 個/mL 的癌細胞懸浮液 1.0 mL，於 37°C 下靜置 60 分鐘。使用人乳腺癌細胞株 MDA-MB-231 作為癌細胞。繼而，使用生理緩衝食鹽水淋洗，對貼附於基板的細胞的個數進行計數。為了使計數容易，利用甲醛將細胞固定後，利用 4,6-二胺基-2-苯基吲哚 (4,6-diamino-2-phenylindole, DAPI) 將細胞核染色。使用共焦雷射顯微鏡 (Olympus FV-1000) 對細胞核的個數進行計數，作為細胞的個數。

圖 5 為表示實驗例 II-4 的結果的圖表。實驗是各進行 5 次，以平均值±標準偏差表示結果。實例 II-1 的鎳基板捕捉到 2000 個以上的癌細胞。實例 II-2 的鎳基板捕捉到 1500 個以上的癌細胞。另外，實例 II-3 的鎳基板捕捉到 500 個以上的癌細胞。與該些鎳基板相比較，比較例 II-1 的鎳基板僅可捕捉到 140 個左右的癌細胞。

(實驗例 III-1)

(聚[甲基丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]的合成)

合成上述通式 (1) 中 R^1 為甲基、 R^2 為乙基、 m 為 2 的聚[甲基丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]。具體而言，將甲基丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯 15.0 g (7.4×10^{-2} mol) 溶解於 1,4-二氧陸園 58.2 mL 中，進行 2 小時 N_2 通氣。將

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正頁

修正日期:104 年 9 月 17 日

起始劑偶氮雙異丁腈 15.1 mg (9.2×10^{-2} mmol) 溶解於少量的 1,4-二氧陸園中並添加至上述溶液中，於氮氣環境下於 75°C 下進行 2 小時 10 分鐘聚合。純化是使用己烷來進行。將反應液滴加至作為貧溶劑的己烷 1500 mL 中，藉由傾析將溶劑去除。於該粗聚合物中添加四氫呋喃 (THF) 約 50 mL 並溶解，再次滴加至己烷 1000 mL 中而使其析出後，藉由傾析將溶劑去除。再一次重複該操作，將聚合物中所含的單體及起始劑完全去除。減壓乾燥一晚，測定質量。獲得無色透明且為澱粉糖漿(starch syrup)狀的聚合物即聚[甲基丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]，產量為 5.36 g，產率為 35.7%。根據 GPC 的分子量分析的結果，數量平均分子量 (Mn) 為 142,000，分子量分布 (Mw/Mn) 為 6.06。聚合物的分子量是於與實驗例 I-1 相同的 GPC 的測定條件下以標準聚苯乙烯換算分子量計算。

(實驗例 III-2)

(鎳基板的製作)

進行與實驗例 I-2 相同的處理而製作鎳基板。

(實驗例 III-3)

進行與(實驗例 I-3)相同的處理而於鎳基板上被覆聚合物，測定此時的水的靜態接觸角，結果聚[甲基丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]為 0.5 wt/vol% 以上，且接觸角大致穩定為 78°。

(實驗例 III-4)

(基板的準備)

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正頁

修正日期:104 年 9 月 17 日

將實驗例 I-1、實驗例 II-1 及實驗例 III-1 中合成的 5 種聚合物溶解於氯仿中，獲得 4 質量%溶液。將該些溶液塗佈於實驗例 III-2 中製作的鎳基板上，使溶劑乾燥，以聚合物將鎳基板的表面被覆，製作實例 III-1 (聚丙烯酸甲氧基乙酯)、實例 III-2 (聚[丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯])、實例 III-3 (聚[甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯])、比較例 III-1 (聚(2-甲基丙烯酸醯氧基乙基磷酸膽鹼-共-甲基丙烯酸丁酯)) 及實例 III-4 (聚[甲基丙烯酸-2-(2-乙氧基乙氧基)乙酯]) 的鎳基板。聚合物溶液的塗佈是進行 2 次。根據 X 射線光電子分光儀 (島津製作所，ESCA-1000)，未觀測到來源於鎳基板的鎳的波峰，且檢測到來源於聚合物的碳及氧的波峰，故確認到鎳基板是由聚合物所被覆。

(癌細胞的貼附性試驗)

於實例 III-1~實例 III-4 及比較例 III-1 的鎳基板上，利用移液管滴加藉由添加有 10% 的血清的培養基調整為 10,000 個/mL 的癌細胞懸浮液 1.0 mL，於 37°C 下靜置 60 分鐘。使用肺癌細胞株 A549 作為癌細胞。繼而，使用生理緩衝食鹽水淋洗，對貼附於基板的細胞的個數進行計數。為了使計數容易，利用甲醛將細胞固定後，利用 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-diamino-2-phenylindole, DAPI) 將細胞核染色。使用共焦點雷射顯微鏡 (Olympus FV-1000) 對細胞核的個數進行計數，作為細胞的個數。

圖 6 為表示實驗例 III-4 的結果的圖表。實驗是各進行

為第 101121020 號中文說明書無劃線修正頁

修正日期:104 年 9 月 17 日

5 次，以平均值±標準偏差來表示結果。實例 III-1 及實例 III-4 的鎳基板捕捉到 6000 個/cm² 以上的癌細胞。實例 III-2 的鎳基板捕捉到 5000 個/cm² 以上的癌細胞。另外，實例 III-3 的鎳基板捕捉到 2000 個/cm² 以上的癌細胞。另一方面，比較例 III-1 的鎳基板僅可捕捉到 130 個/cm² 左右的癌細胞。

【圖式簡單說明】

圖 1 為表示癌細胞濃縮過濾器的一實施形態的概略圖。

圖 2 為表示實驗例 I-3 的結果的圖表。A 為塗佈 1 次聚合物溶液的結果，B 為塗佈 2 次聚合物溶液的結果，C 為陽性對照組。

圖 3 為表示實驗例 I-4 的結果的圖表。

圖 4 為表示實驗例 I-5 的結果的圖表。

圖 5 為表示實驗例 II-4 的結果的圖表。

圖 6 為表示實驗例 III-4 的結果的圖表。

【主要元件符號說明】

10：貫通孔

20：基板

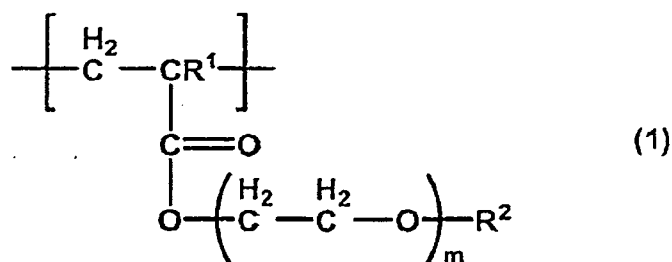
30：面

100：過濾器

七、申請專利範圍：

1. 一種癌細胞貼附性促進劑，包括：

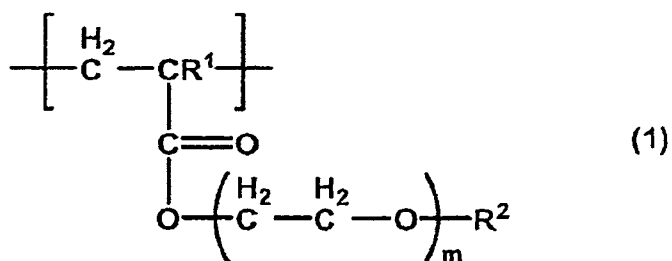
含有下述通式 (1) 所表示的結構單元的聚合物，



[式中，R¹ 為氫原子，R² 為乙基，m 為 2]。

2. 一種癌細胞貼附性促進劑，包括：

含有下述通式 (1) 所表示的結構單元的聚合物，



[式中，R¹ 為甲基，R² 為甲基，m 為 2]。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之癌細胞貼附性促進劑，其包括由上述通式 (1) 所表示的結構單元所構成的聚合物。

4. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之癌細胞貼附性促進劑，其中數量平均分子量為 10,000~300,000。

為第 101121020 號中文專利範圍無劃線修正本

修正日期:104 年 9 月 17 日

5. 一種癌細胞濃縮過濾器，包括：

形成有多個貫通孔的基板，且上述基板的至少一部分是由如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項所述之癌細胞貼附性促進劑所被覆。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之癌細胞濃縮過濾器，其中上述貫通孔的平均孔徑為 5 μm 以上、小於 30 μm ，且平均開口率為 5% 以上、小於 50%。

7 如申請專利範圍第 5 項或第 6 項所述之癌細胞濃縮過濾器，其中上述基板包含金屬。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之癌細胞濃縮過濾器，其中上述金屬是選自由銅、鎳、銅與鎳的合金以及該些金屬的表面經鍍金而成者所組成的組群中。

9. 如申請專利範圍第 7 項所述之癌細胞濃縮過濾器，其中上述貫通孔是藉由電氣鑄造法而形成。

10. 一種檢測癌細胞的存在的方法，包括：

過濾步驟，上述過濾步驟利用如申請專利範圍第 5 項至第 9 項中任一項所述之癌細胞濃縮過濾器對末梢血進行過濾。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，更包括：對上述過濾步驟中經濃縮的細胞的基因進行分析的步驟。

12 如申請專利範圍第 10 項或第 11 項所述之方法，更包括：對上述過濾步驟中經濃縮的細胞進行培養的步驟。

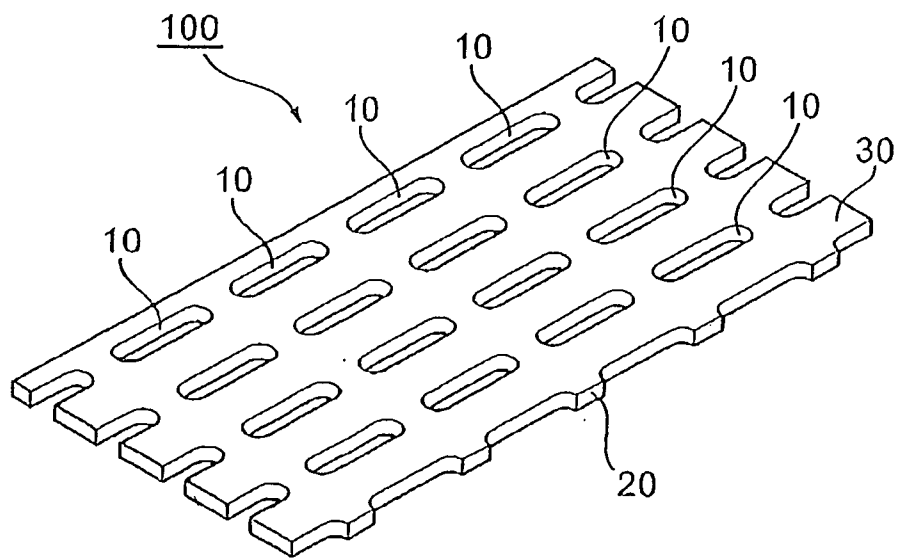


圖 1

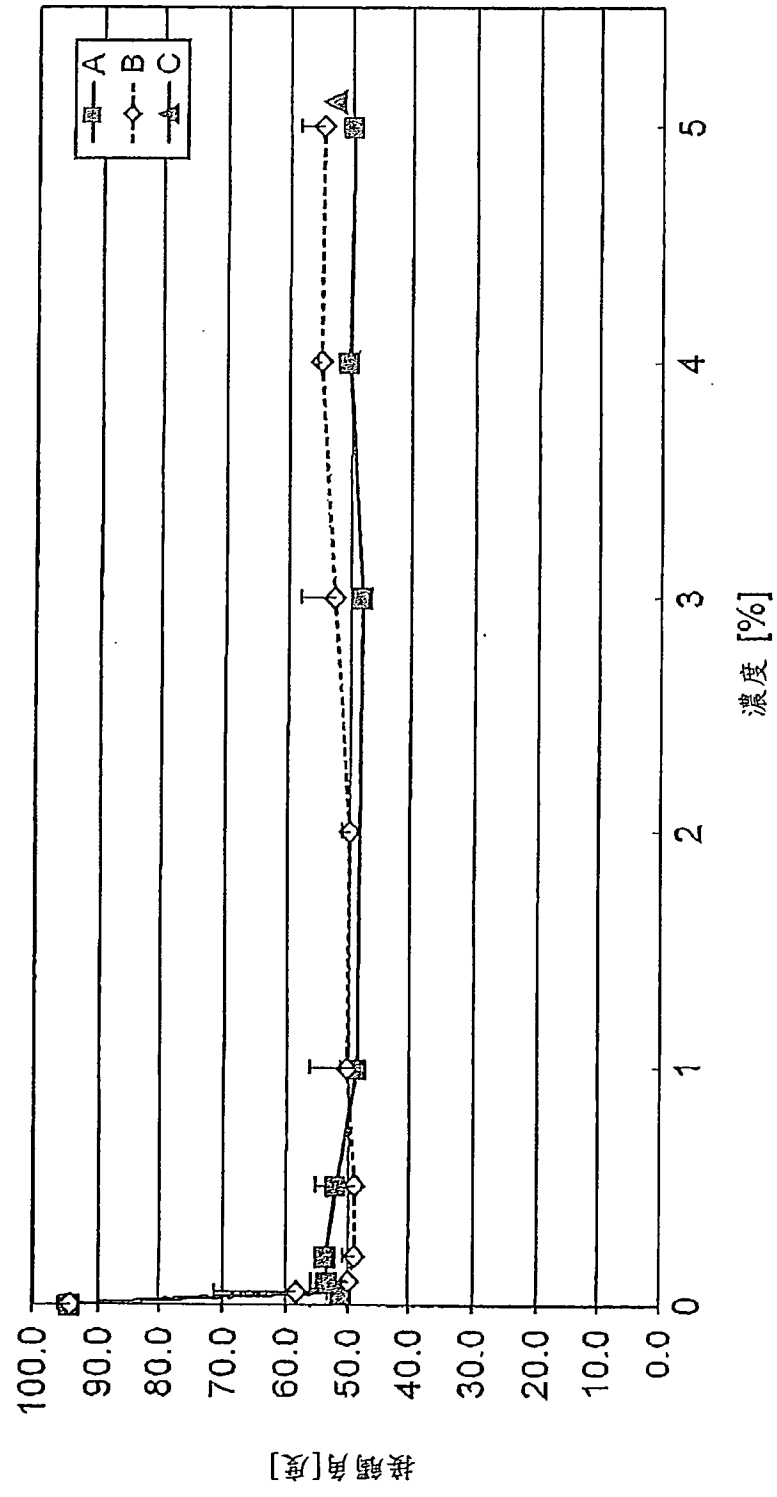


圖 2

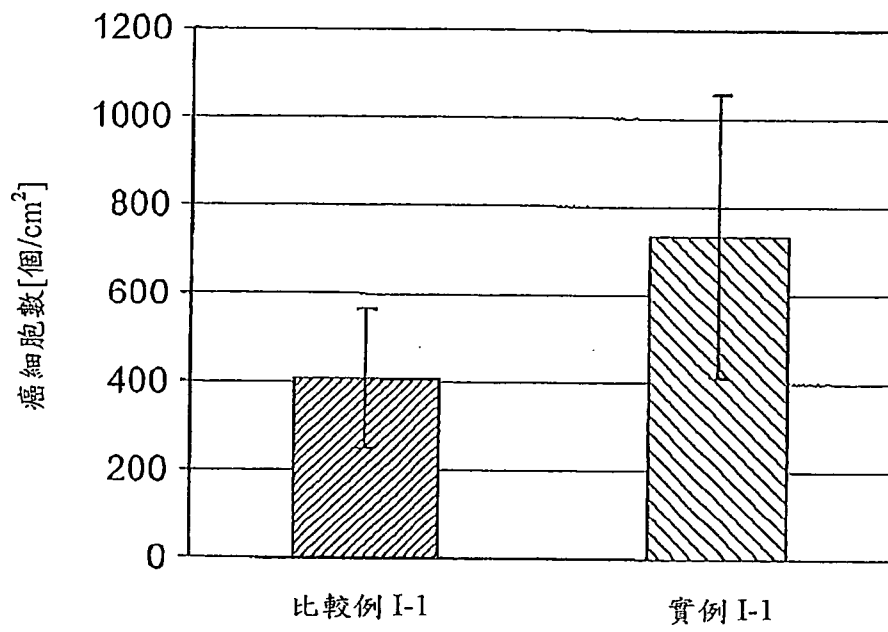


圖 3

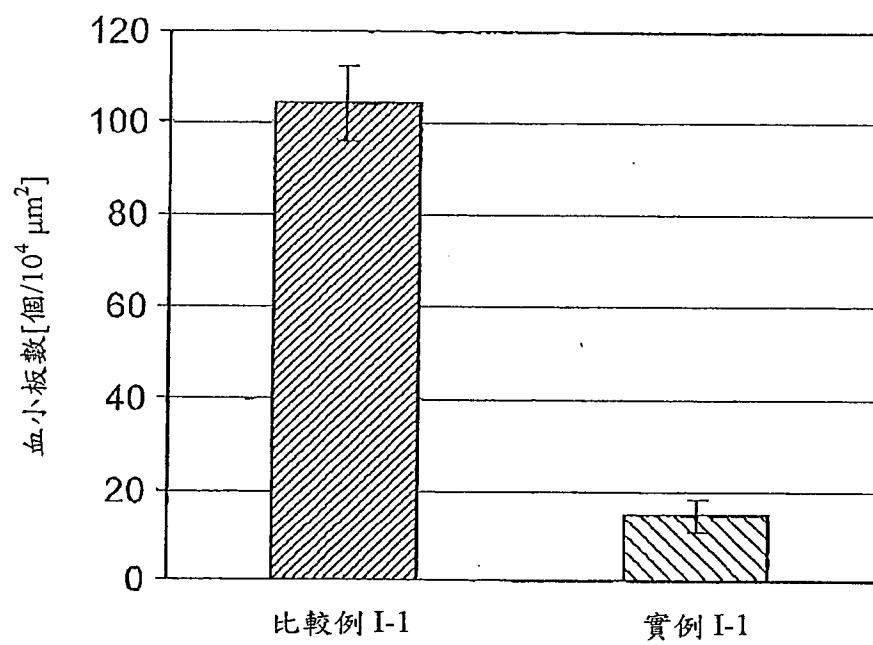


圖 4

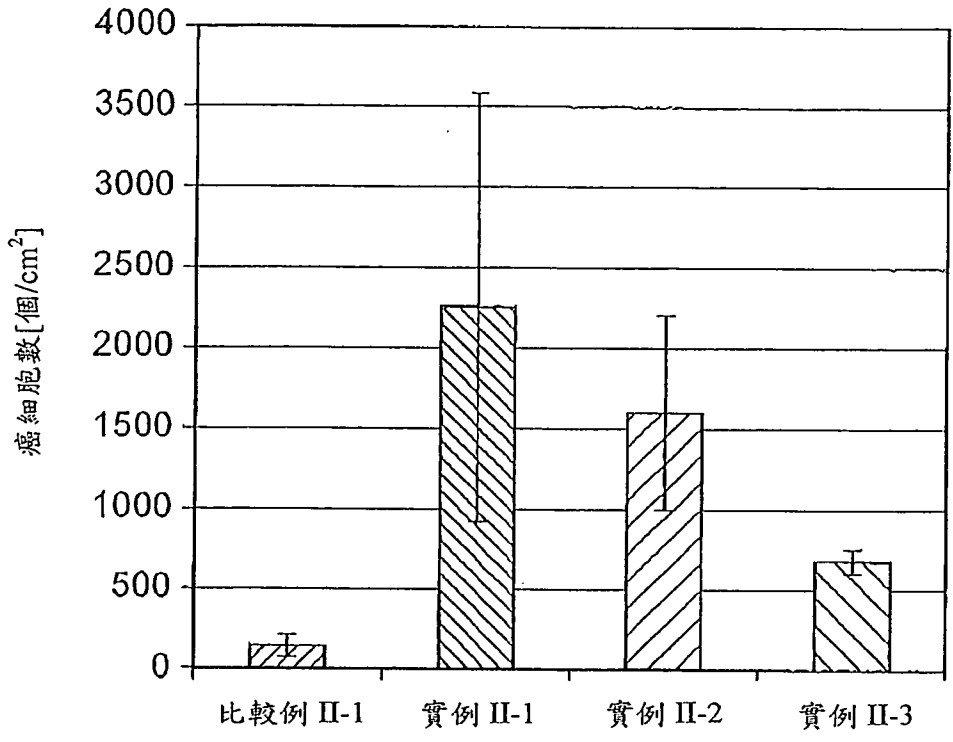


圖 5

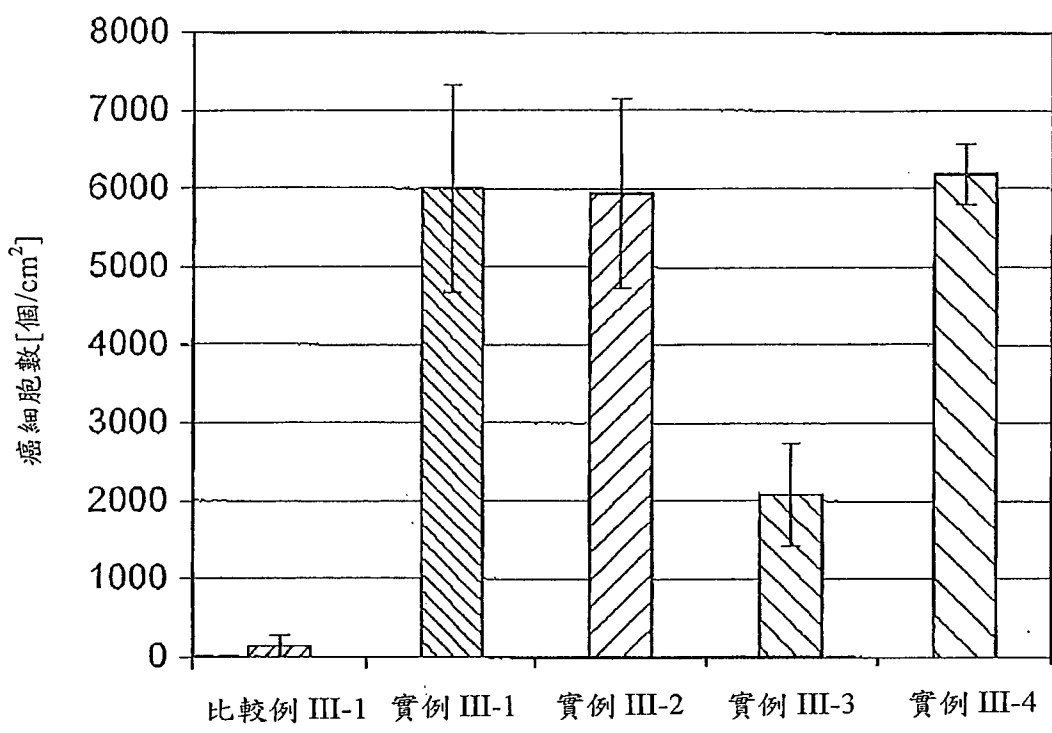


圖 6