【19】中華民國　　【12】專利公報　（B）

【11】證書號數：I941099
【45】公告日： 中華民國 115 (2026) 年 10 月 01 日
【51】Int. Cl.：　*C07K17/08 (2006.01)*　*C12N5/0783 (2010.01)*
C12M1/14 (2006.01)

發明　　全 10 頁

【54】名　稱：一種自然殺手細胞分離薄膜及其塗層組成

【21】申請案號：114107829　　【22】申請日： 中華民國 114 (2025) 年 02 月 27 日
【11】公開編號：202635744　　【43】公開日期： 中華民國 115 (2026) 年 09 月 01 日

【72】發 明 人： 張雍 (TW) CHANG, YUNG
【71】申 請 人： 中原大學　CHUNG YUAN CHRISTIAN UNIVERSITY
桃園市中壢區中北路 200 號
【74】代 理 人： 陳福龍

【56】參考文獻：
期刊 Hou et al., “Capture and Stimulated Release of Circulating Tumor Cells on Polymer Grafted Silicon Nanostructures”, Advanced materials, 2013, 25(11), pp 1547-1551.

審查人員：方冠岳

【57】申請專利範圍

1. 一種自然殺手細胞分離薄膜，其組成包含一塗層和一基材，該塗層的組成包含複數個抗體，該抗體是抗 CD56 抗體或生物素標記的抗 CD56 抗體，複數個鏈黴親合素和一具有複數個羧酸基團的聚合物，該具有複數個羧酸基團的聚合物包含丙烯酸水膠、聚丙烯酸、(丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚物、(丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚網絡水膠、(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚物、(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚網絡水膠或其組合，該複數個抗體藉由生物素結合該複數個鏈黴親合素，和該複數個鏈黴親合素以化學鍵耦接在該具有複數個羧酸基團的聚合物上，藉此組成該塗層；和該塗層披覆在該基材上，藉此構成所述的自然殺手細胞分離薄膜。
2. 如請求項 1 所述的自然殺手細胞分離薄膜，該丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚物或該(丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚網絡水膠的丙烯酸對 N-烷基丙烯醯胺的莫耳比值是 1~20。
3. 如請求項 1 所述的自然殺手細胞分離薄膜，該(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚物和(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚網絡水膠的烷基是碳數 1~18 的直鏈狀烷基、碳數 3~18 的分支狀烷基或碳數 3~8 的環狀烷基。
4. 如請求項 1 所述的自然殺手細胞分離薄膜，該化學鍵是選自下列群組之一或其組合：醯胺鍵、酯鍵、縮醛鍵、縮酮鍵、醚鍵和雙硫鍵。
5. 如請求項 1 所述的自然殺手細胞分離薄膜，該塗層的傅立葉紅外光譜圖在以下波數範圍具有吸收峰：1545-1579cm^{-1}、1627-1654cm^{-1}、1710-1740cm^{-1} 和 3000-3600cm^{-1}。
6. 一種自樣本分離回收自然殺手細胞的方法，其包含下述步驟：使一包含自然殺手細胞的樣本在 30~40℃接觸一自然殺手細胞分離薄膜，藉此使該自然殺手細胞吸附在該自然殺手細胞分離薄膜上；該自然殺手細胞分離薄膜的組成包含一塗層和一基材，該塗層的組成包含複數個抗體，該抗體是抗 CD56 抗體或生物素標記的抗 CD56 抗體，複數個鏈黴親合素和一具有複數個羧酸基團的聚合物，該具有複數個羧酸基團的聚合物包含丙烯酸

水膠、聚丙烯酸、(丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚物、(丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚網絡水膠、(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚物、(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚網絡水膠或其組合，該複數個抗體藉由生物素結合該複數個鏈黴親合素，和該複數個鏈黴親合素以化學鍵耦接在該具有複數個羧酸基團的聚合物上，藉此組成該塗層；和該塗層披覆在該基材上，藉此構成所述的自然殺手細胞分離薄膜；執行一脫附程序，使該自然殺手細胞分離薄膜在 0~10℃孵化至少 10 分鐘或浸泡在含有生物素的溶液，藉此使吸附在該自然殺手細胞分離薄膜上的自然殺手細胞脫附；和執行一回收程序，在 0~10℃以溶液沖提該自然殺手細胞分離薄膜，藉此回收脫附的自然殺手細胞，達到自該樣本分離回收自然殺手細胞。

7. 請求項 6 所述的自樣本分離回收自然殺手細胞的方法，該丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚物或該(丙烯酸-N-烷基丙烯醯胺)共聚網絡水膠的丙烯酸對 N-烷基丙烯醯胺的莫耳比值是 1~20。
8. 如請求項 6 所述的自樣本分離回收自然殺手細胞的方法，該(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚物和(丙烯酸-甲基丙烯酸烷基酯)共聚網絡水膠的烷基是碳數 1~18 的直鏈狀烷基、碳數 3~18 的分支狀烷基或碳數 3~8 的環狀烷基。
9. 如請求項 6 所述的自樣本分離回收自然殺手細胞的方法，該化學鍵是選自下列群組之一或其組合：醯胺鍵、酯鍵、縮醛鍵、縮酮鍵、醚鍵和雙硫鍵。
10. 如請求項 6 所述的自樣本分離回收自然殺手細胞的方法，該塗層的傅立葉紅外光譜圖在以下波數範圍具有吸收峰：1545-1579cm^{-1}、1627-1654cm^{-1}、1710-1740cm^{-1} 和 3000-3600cm^{-1}。

圖式簡單說明

〔圖 1〕係本發明的(丙烯酸-N-異丙基丙烯醯胺)共聚網絡水膠和(丙烯酸-甲基丙烯酸丁基酯)共聚物的反應方程式。

〔圖 2〕係本發明的塗層結構合成示意圖；(A)是錨定鏈黴親合素在具有複數個羧酸基團的聚合物的示意圖；(B)是形成生物素標記的抗體與鏈黴親合素複合體的示意圖。

〔圖 3〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜的塗層的傅立葉紅外光譜圖。

〔圖 4〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜的塗層的吸水度和水膠面積差的長條圖；(A)是對照組的吸水度的長條圖；(B)是實驗組的吸水度的長條圖；(C)是對照組的水膠面積差的長條圖；(D)是實驗組的水膠面積差的長條圖。

〔圖 5〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜的塗層的二碘甲烷接觸角；(A)是 4℃的二碘甲烷接觸角；(B)是 37℃的二碘甲烷接觸角。

〔圖 6〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜的塗層的對照組和實驗組的吸水度曲線圖。

〔圖 7〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜的塗層的纖維蛋白原黏附度的長條圖；(A)是 4℃的纖維蛋白原黏附度的長條圖；(B)是 37℃的纖維蛋白原黏附度的長條圖。

〔圖 8〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜的塗層的細胞相對生存率長條圖；(A)是對照組的細胞相對生存率長條圖；(B)是實驗組的細胞相對生存率長條圖。

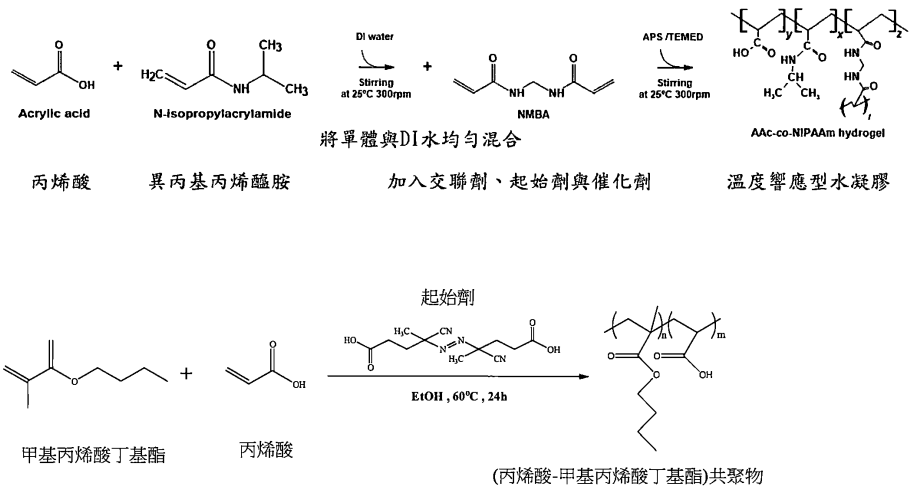
〔圖 9〕係本發明的具有鏈黴親合素耦接的(丙烯酸-甲基丙烯酸丁基酯)共聚物(A1~A4)在不同酸鹼值下對生物素標記的抗體的貼附率長條圖。

〔圖 10〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜(A1~A4，A1E~A4E)的塗層密度長條圖。

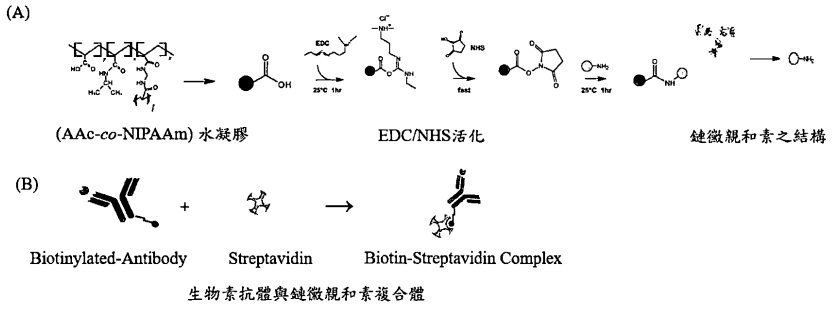
〔圖 11〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜(A1~A4，A1E~A4E)的孔隙度長條圖。

〔圖 12〕係本發明的自然殺手細胞分離薄膜(A1~A4，A1E~A4E)的水合能力長條圖。

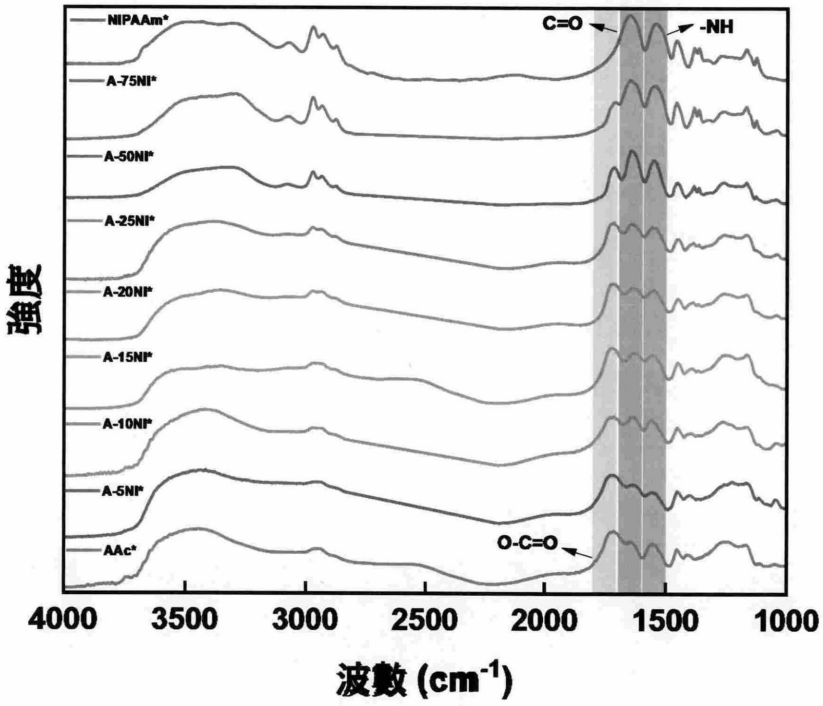
(3)


DI water
Stirring
at 25°C 300rpm
APS /TEMED
Stirring
at 25°C 300rpm
Acrylic acid
N-isopropylacrylamide
NMBA
AAc-co-NIPAAm hydrogel
將單體與DI水均勻混合
丙烯酸
異丙基丙烯醯胺
加入交聯劑、起始劑與催化劑
溫度響應型水凝膠
起始劑
EtOH , 60°C , 24h
甲基丙烯酸丁基酯
丙烯酸
(丙烯酸-甲基丙烯酸丁基酯)共聚物

【圖 1】


(A)
EDC
NHS
(AAc-co-NIPAAm) 水凝膠
EDC/NHS活化
(B)
Biotinylated-Antibody
Streptavidin
Biotin-Streptavidin Complex
生物素抗體與鏈黴親和素複合體

【圖 2】


NIPAAm*
A-75NI*
A-50NI*
A-25NI*
A-20NI*
A-15NI*
A-10NI*
A-5NI*
AAc*
C=O
-NH
O-C=O
強度
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
波數 (cm-1)

【圖 3】

圖4 (A)

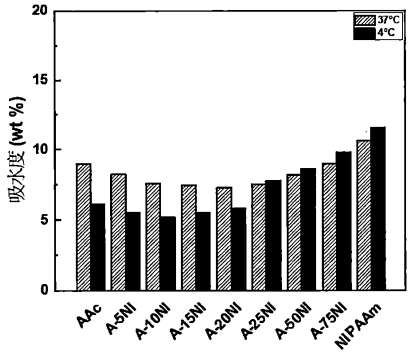


圖4 (B)

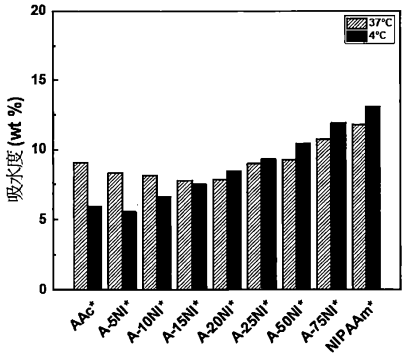


圖4 (C)

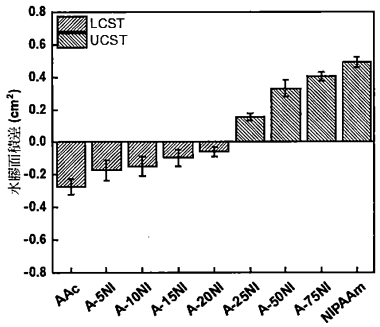
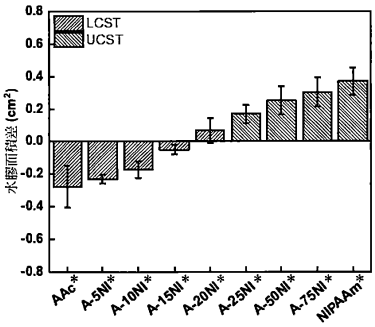
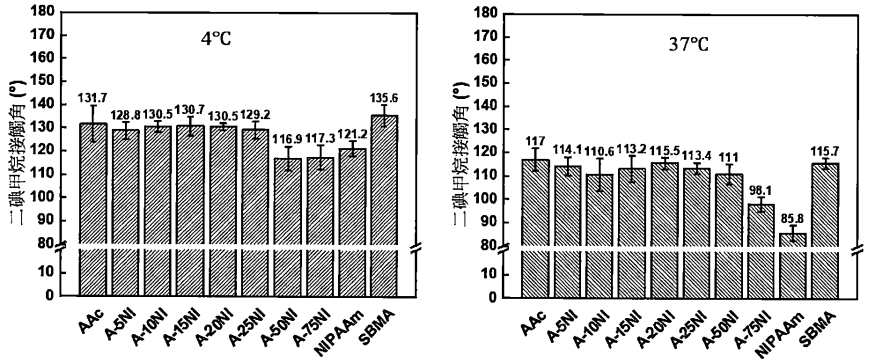


圖4 (D)

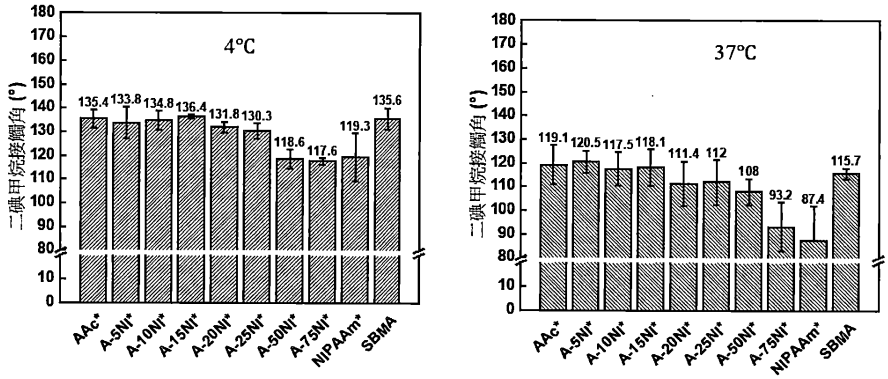


【圖 4】

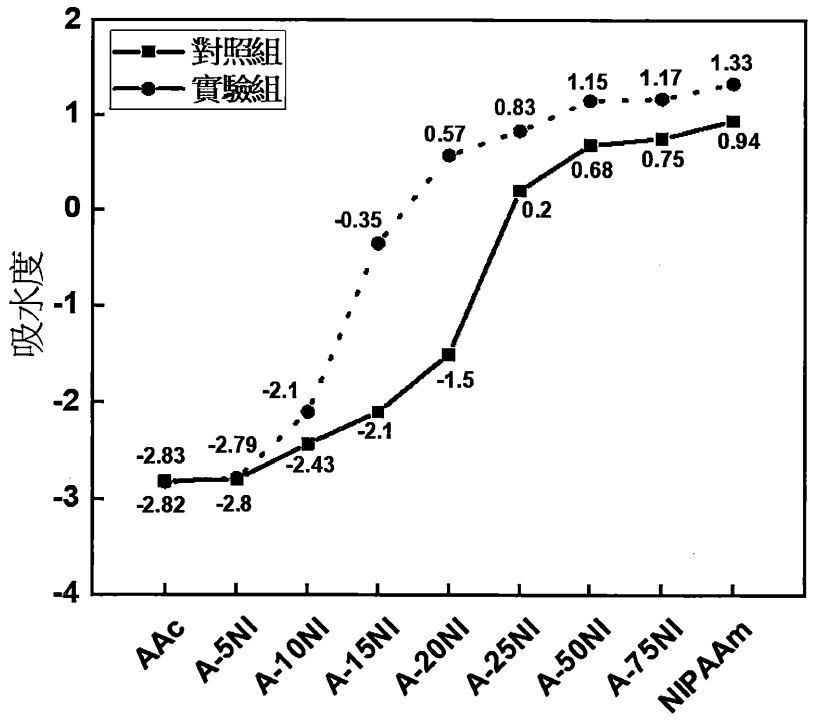
5A


4℃
37℃
二碘甲烷接觸角 (°)
131.7
128.8
130.5
130.7
130.5
129.2
116.9
117.3
121.2
135.6
117
114.1
110.6
113.2
115.5
113.4
111
98.1
85.8
115.7
AAc
A-5NI
A-10NI
A-15NI
A-20NI
A-25NI
A-50NI
A-75NI
NIPAAm
SBMA

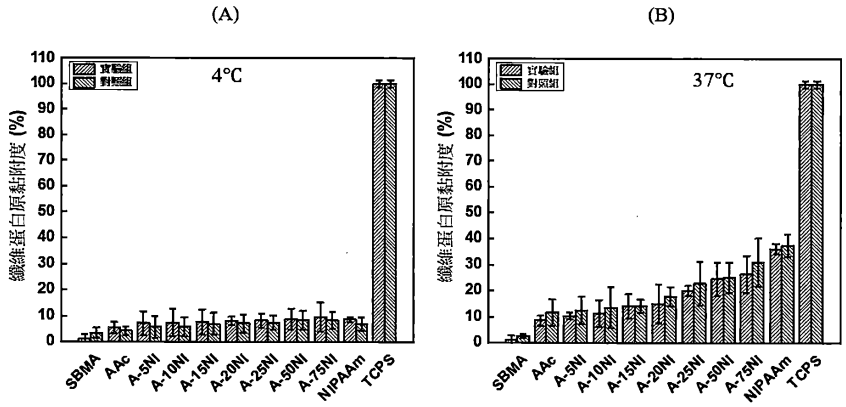
5B


4℃
37℃
二碘甲烷接觸角 (°)
135.4
133.8
134.8
136.4
131.8
130.3
118.6
117.6
119.3
135.6
119.1
120.5
117.5
118.1
111.4
112
108
93.2
87.4
115.7
AAc*
A-5NI*
A-10NI*
A-15NI*
A-20NI*
A-25NI*
A-50NI*
A-75NI*
NIPAAm*
SBMA

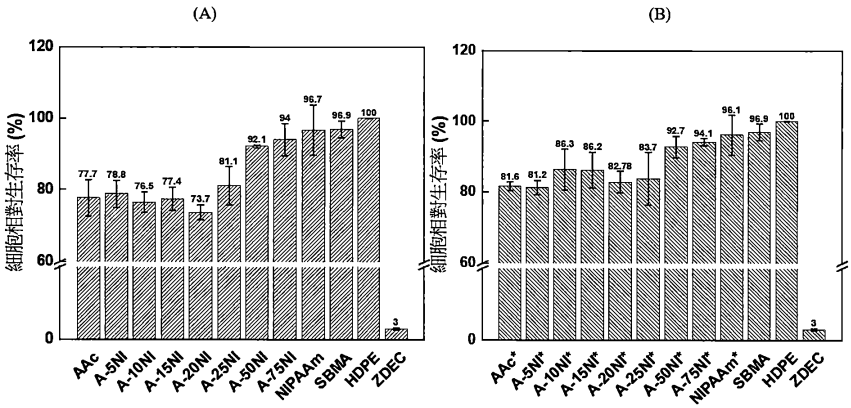
【圖 5】


對照組
實驗組
吸水度
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-2.83
-2.82
-2.79
-2.8
-2.1
-2.43
-0.35
-2.1
0.57
-1.5
0.83
0.2
1.15
0.68
1.17
0.75
1.33
0.94
AAc
A-5NI
A-10NI
A-15NI
A-20NI
A-25NI
A-50NI
A-75NI
NIPAAm

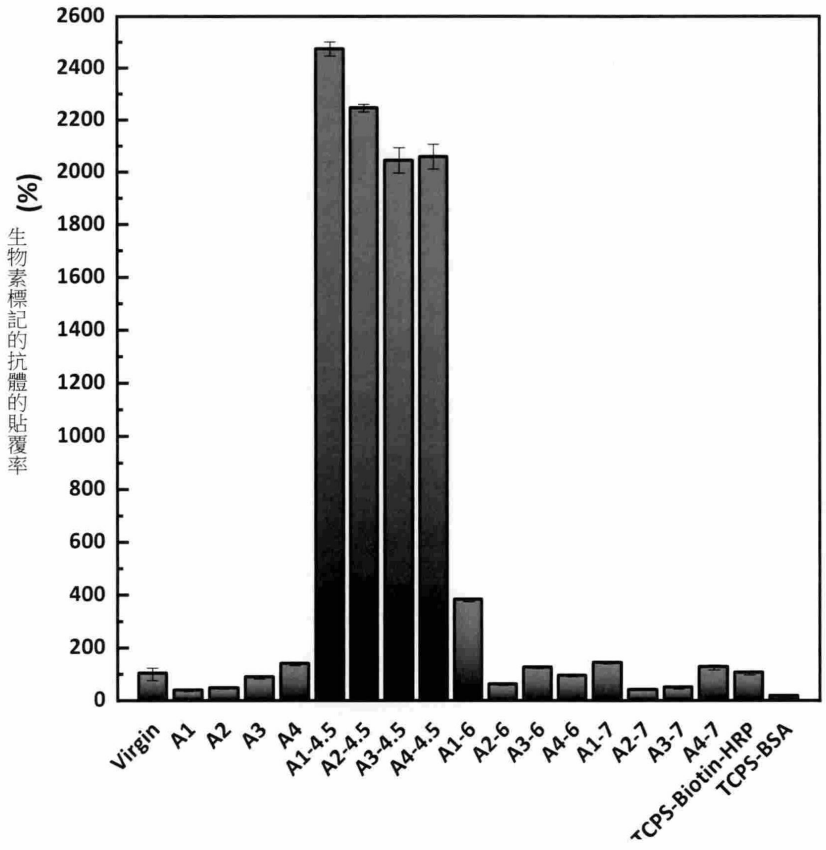
【圖 6】


(A)
(B)
4°C
37°C
纖維蛋白原黏附度 (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
SBMA
AAc
A-5NI
A-10NI
A-15NI
A-20NI
A-25NI
A-50NI
A-75NI
NIPAAm
TCPS

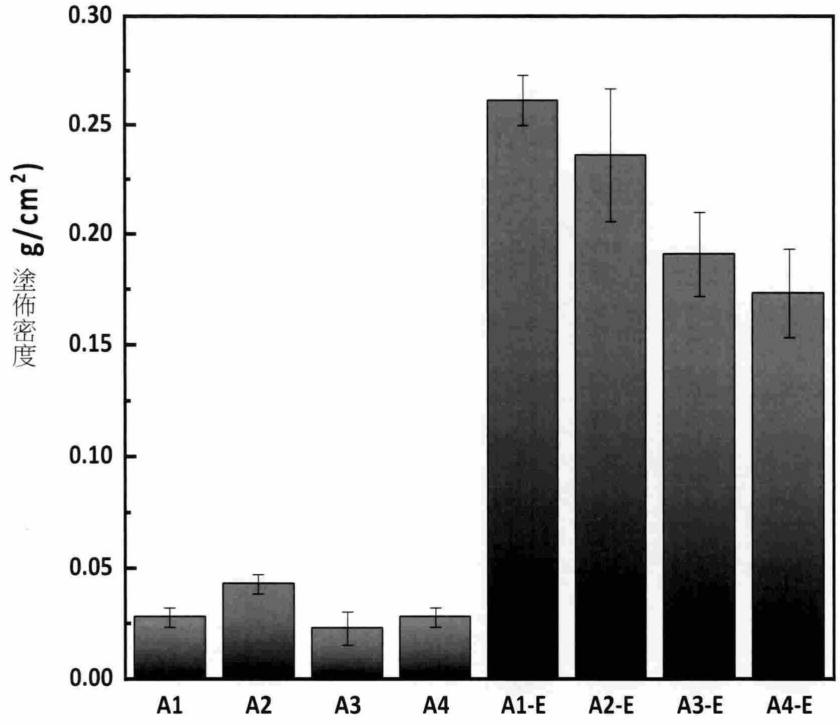
【圖 7】


(A)
(B)
細胞相對生存率 (%)
120
100
80
60
0
77.7
78.8
76.5
77.4
73.7
81.1
92.1
94
96.7
96.9
100
3
81.6
81.2
86.3
86.2
82.78
83.7
92.7
94.1
96.1
96.9
100
3
AAc
A-5NI
A-10NI
A-15NI
A-20NI
A-25NI
A-50NI
A-75NI
NIPAAm
SBMA
HDPE
ZDEC
AAc*
A-5NI*
A-10NI*
A-15NI*
A-20NI*
A-25NI*
A-50NI*
A-75NI*
NIPAAm*
SBMA
HDPE
ZDEC

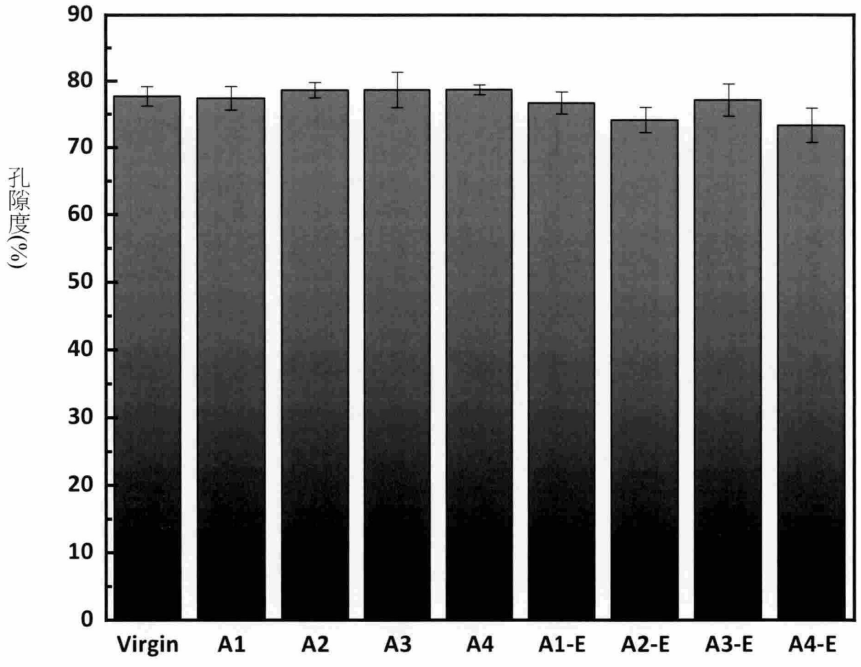
【圖 8】


生物素標記的抗體的貼覆率 (%)
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Virgin
A1
A2
A3
A4
A1-4.5
A2-4.5
A3-4.5
A4-4.5
A1-6
A2-6
A3-6
A4-6
A1-7
A2-7
A3-7
A4-7
TCPS-Biotin-HRP
TCPS-BSA

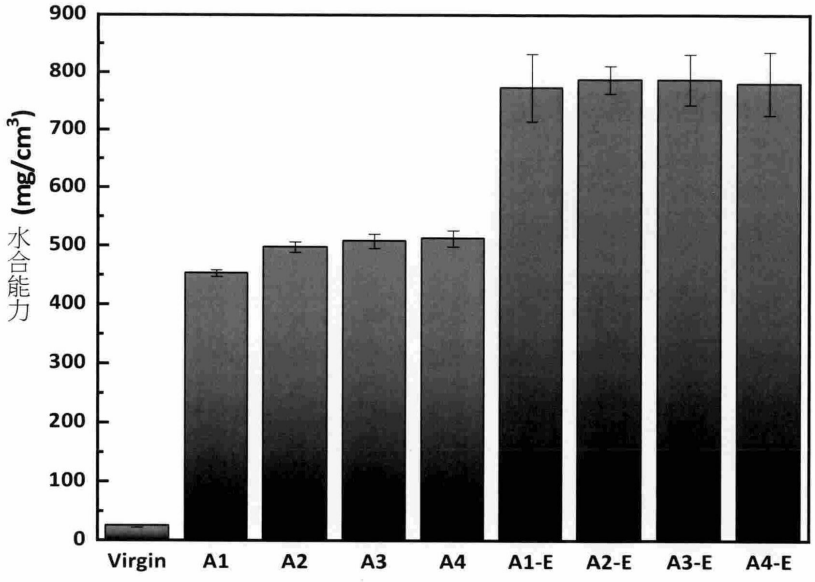
【圖 9】


0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
g/cm²)
塗佈密度
A1
A2
A3
A4
A1-E
A2-E
A3-E
A4-E

【圖 10】


90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
孔隙度(%)
Virgin
A1
A2
A3
A4
A1-E
A2-E
A3-E
A4-E

【圖 11】


900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
(mg/cm3)
水合能力
Virgin
A1
A2
A3
A4
A1-E
A2-E
A3-E
A4-E

【圖 12】