

公告本

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：97121427

※ 申請日期：97.7.18

※IPC 分類：G01N 33/53 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

IL-8 作為偵測尿石症的生物標記

IL-8 AS BIOMARKER FOR THE DETECTION OF UROLITHIASIS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

高雄醫學大學/KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

余幸司/YU, HSIN-SU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

807高雄市三民區十全一路100號/100 SHIH-CHUAN 1ST ROAD, SAN
MING DISTRICT, KAOHSIUNG CITY 807, TAIWAN

國 稷：(中文/英文)

中華民國/R.O.C.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 卓夙航/JUO, SUH-HANG HANK
2. 孫昭玲/SUEN, JAU-LING
3. 周以和/CHOU, YII-HER

國 稷：(中文/英文)

1. 2. 3. 中華民國/R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第22條第2項 第1款或 第2款規定之事實，其事實發生
日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第27條第1項國際優先權：

無主張專利法第27條第1項國際優先權：

1. 美國；2008.7.18.；USSN 12/175,674

主張專利法第29條第1項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第30條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明揭示一種用於偵測或初步篩選尿石症的方法，其包含有：偵測一取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預設標準相比較；其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵。

六、英文發明摘要：

Disclosed herein is a method for the detection or preliminary screening of urolithiasis, comprising: detecting the IL-8 level and the creatinine level in a urine sample taken from a human subject suspected to have urolithiasis; obtaining a creatinine-normalized IL-8 level in the urine sample by normalizing the detected IL-8 level to the detected creatinine level; and comparing the creatinine-normalized IL-8 level in the urine sample with a predetermined standard; wherein an elevation of the creatinine-normalized IL-8 level in the urine sample as compared to the predetermined standard is indicative of urolithiasis.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（2）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明是有關於介白素-8 (interleukin-8, IL-8)作為一種用於偵測尿石症(urolithiasis)的生物標記的發現。根據此發現，本發明提供一種用於偵測、初步篩選或監測尿石症的方法，其中IL-8被用作為一針對尿石症的生物標記。

【先前技術】

發明背景

尿石症(urolithiasis)[一種涉及在腎臟(kidney)、膀胱(bladder)，和/或尿道(urinary tract)中結石(stones)的發展的病況(condition)]是一種在全世界具有一為5至10%的盛行率(prevalence)的常見疾病。它是一種在健康看護工業上具有一重要影響力之快速增加的普遍問題。尿石症是一種多因性疾病(multifactorial disease)，並且它的潛在病因學(underlying etiology)尚未被充分地瞭解。有關於發展出尿結石(urinary stones)的風險因子包括遺傳學、年齡、性別、地理學、季節因子、膳食以及職業(M. Monga *et al.* (2006), *J. Urol.*, 175(6): 2125-2128)。

尿液(urine)通常被過飽和以草酸鹽離子(oxalate ions)以及鈣(calcium)。在適當的條件之下，它將會致使草酸鈣結晶(calcium oxalate crystals)的形成。這些結晶可以經由結合至管狀細胞(tubular cells)而被滯留在腎臟中(Dirk J. Kok *et al.* (1994), *Kidney International*, 46:847-854)，並且接而聚

集以形成較大者。因此，結晶生長、聚集(aggregation)以及滯留(retention)全部都是尿石症發展的重要方面。

在特定的高酸草醯脲的病況(hyperoxaluric conditions)當中，被滯留的結晶移行至組織間隙(interstitium)之內而誘導非-感染性發炎(non-infectious inflammation)。數個研究已經顯示：腎結石(renal stones)在活體外(*iv vitro*)可以刺激腎細胞(renal cells)分泌發炎性介質(inflammatory mediators)，諸如單核細胞趨化蛋白質-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1，亦被知曉為CCL2)(Tohru Umekawa *et al.* (2002), *Kidney International*, 61:105-112)以及腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)(R. de Water *et al.* (2001), *Am. J. Kidney Dis.*, 38(2):331-8)。因此，腎組織的發炎性反應(inflammatory responses)在尿石症的疾病過程(disease process)中扮演一個重要的角色(Saeed R. Khan (2004), *Clin. Exp. Nephrol.*, 8(2):75-88)。

目前，多數具有尿石症的病患在症狀(symptoms)發展之後被診斷出。一個針對尿石症之可信賴的生物標記可以致使早期診斷(earlier diagnosis)、治療(treatment)以及較佳的病程的監測。然而，非常少數的研究已經詳細地檢測在具有尿石症的病患體內的尿液發炎性細胞激素(inflammatory cytokines)以及趨化激素(chemokines)。

在*J. Urol.*, December 1998, 160: 2284-2288, Eugene Rhee *et al.* 中評估細胞激素IL-1 β 、IL-1 α 以及IL-6在具有

尿石症的病患體內的可能角色。他們比較具有尿石症的病患、具有細菌性膀胱炎(bacterial cystitis)的病患以及正常個體(normal subjects)的尿液樣品，並且發現：相對於正常個體，具有尿石症的病患顯示出在IL-6上的顯著升高，在IL-1
 5 β 或IL-1 α 上則沒有顯著的增高，而具有細菌性膀胱炎的病患顯示出在IL-6、IL-1 β 以及IL-1 α 上的顯著升高。Eugene Rhee等人的結果揭示：IL-6本身不能區別細菌性膀胱炎與尿石症，但是IL- β 以及IL-6的組合可以做到這樣。

鑑於前面所述，探究一針對尿石症的預測性生物標記(predictive biomarker)是高度所欲的。於是，申請人研究來自具有尿石症的病患的尿液發炎性細胞激素以及趨化激素圖譜(profiles)是否可被用作為針對尿石症的診斷標記。申請人從實驗中發現：尿液的IL-8可應用於作為一用於偵測尿石症的可能生物標記。

15 【發明內容】

發明概要

因此，依據一第一個方面，本發明提供一種用於偵測或初步篩選一人類個體體內的尿石症的方法，其包含有：

20 偵測—取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；

藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及

令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預

設標準(predetermined standard)相比較；

其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵(indicative)。

在一第二個方面，本發明提供一種用於監測一人類個體體內的尿石症的方法，其包含有：

偵測定期地取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；

藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及

令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預設標準相比較；

其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵。

本發明的其他的特徵以及優點，在參照下面的較佳實施例之詳細說明以及隨文檢附的圖式後，將變得明顯。

發明的詳細說明

為了本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：術語“包含有(comprising)”意指“包含但不限於”，以及術語“包括(comprises)”具有一對應的意義。

要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其它國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

除非另外有所定義，本文中所使用的所有技術性與科

學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。一熟悉此技藝者會認知到許多與那些被描述於本文中者相似或等效的方法和材料，它們可被用於實施本發明。當然，本發明決不受到所描述的方法和材料之限制。為表清楚，下面的界定被使用於本文中。

近來，尿石症在一般人口中的盛行率已經增高。過多的腎結晶刺激一系列在腎臟中的反應(包括局部損傷以及非-感染性發炎)。這些發炎性反應在尿石症的發展上可能扮演一個重要的角色。

在發炎的期間，細胞激素以及趨化激素在連結先天性以及適應性免疫上扮演一個重要的角色。由類鐸受體(toll-like receptor, TLR)所刺激的組織巨噬細胞(tissue macrophages)或樹突細胞(dendritic cells)可分泌各種不同的趨化激素，諸如介白素8(IL-8，亦被知曉為CXCL8)、RANTES [調節於活化、正常T-細胞的表現與分泌方面，亦被知曉為CCL5]、巨噬細胞發炎性蛋白質-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha, MIP-1 α ，亦被知曉為CCL3)以及MIP-1 β (亦被知曉為CCL4)(Fabio Re and Jack L. Strominger (2001), *J. Biol. Chem.*, 276(40):37692-37699)。

IL-8是針對嗜中性白血球(neutrophils)的關鍵趨化劑(chemoattractant)，而RANTES、MIP-1 α 以及MIP-1 β 是針對未成熟的樹突以及自然殺手(NK)細胞[immature dendritic and natural killer (NK) cells]的趨化性因子(chemotactic factors)。NK細胞是干擾素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)

的一重要來源，干擾素- γ 誘導藉由IFN- γ 所誘導的單核因子(monokine)(Mig，亦被知曉為CXCL9)以及IFN- γ 誘導型10-kd蛋白質(IFN- γ inducible 10-kd protein, IP-10，亦被知曉為CXCL10)的生成。依次地，Mig以及IP-10將被活化的T細胞吸引至發炎的位址(inflamed sites)(Thais P. Salazar-Mather *et al.* (2000), *J. Clin. Invest.*, 105(7): 985-993)。

再者，巨噬細胞以及內皮細胞(endothelial cells)可產生MCP-1/CCL2來吸引額外的巨噬細胞(Kouji Matsushima *et al.* (1989), *J. Exp. Med.*, 169:1485-1490; Teizo Yoshimura *et al.* (1989), *J. Exp. Med.*, 169:1449-1450)，而由病原體(pathogens)所刺激的未成熟的樹突細胞可產生IL-12、TNF- α 或IL-10 (Jacques Banchereau & Ralph M. Steinman (1998), *Nature*, 392(19): 245-252)。

為了檢測這些在尿石症的情況下被分泌的發炎性介質(inflammatory mediators)，申請人經由多重免疫分析法(multiplex immunoassays)同時地比較在具有尿石症的病患以及健康的對照組之間的中段早晨尿液檢體(midstream morning urine specimens)中的5種發炎性細胞激素以及5種發炎性趨化激素。令人驚訝地發現到：在肌酸酐標準化(creatinine normalization)之後，病患體內的IL-8、RANTES、MCP-1、IP-10、Mig以及IL-6的尿液位準相較於健康的對照組被顯著地增高。然而，尿液的IL-1 β 、IL-10、IL-12以及腫瘤TNF- α 的濃度在具有尿石症的病患與健康

的對照組之間並無顯著地不同。使用受試者操作特徵(ROC)曲線分析 [receiver operating characteristics (ROC) curve analysis]，申請人發現到：關於IL-8的經肌酸酐標準化的位準的截斷點(cutoff point)是6.2 pg/mg肌酸酐。據此數值，診
5 斷的靈敏度(sensitivity)以及專一性(specificity)可分別達到91%以及68%。

因此，本發明提供一種用於偵測或初步篩選一人類個體體內的尿石症的方法，其包含有：

10 偵測一取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；

藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及

15 令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預設標準(predetermined standard)相比較；

其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵(indicative)。

本發明亦提供一種用於監測一人類個體體內的尿石症的方法，其包含有：

20 偵測一定期地取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；

藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及

令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預設標準相比較；

其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵。

5 肌酸酐是一種肌肉活動的副產物(byproduct)，並且藉由腎臟而被清除以及被排泄於尿液中(M. F. Boeniger *et al.* (1993), *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 54(10):615-27)。肌酸酐以一穩定的速率而被形成並且不受膳食或正常身體活動所影響。它在尿液中的濃度是一種用以將一隨取的尿液樣品(spot urine sample)中的尿液溶質排泄物(urinary solute excretion)標準化的可信賴參考數值。因此，在本發明中，
10 肌酸酐被用來校正(correct)尿液中的細胞激素/趨化激素的濃度。

依據本發明，尿液樣品可以在任何時間而取自於一人
15 類個體。較佳地，該尿液樣品是該人類個體的一第一次早晨尿液樣品，並且更佳地是該第一次早晨尿液的一中段樣品(midstream sample)。

IL-8位準可以藉由那些熟習此技藝者所熟知的任何方法(means)而被測量。依據本發明，通常被偏好的是藉由免疫分析法[包括，但不限於：多重免疫分析法、酵素結合免疫吸附分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)、免疫放射量測定分析法(immunoradiometric assay, IRMA)等等]來偵測尿液樣品中的IL-8的數量或位準。

依據本發明，定量IL-8是使用一種會專一性地結合IL-8之以抗體為基礎的結合部分(antibody-based binding moiety)而被進行。在本發明之一更佳的具體例中，該以抗體為基礎的結合部分被標記以一選自於下列所構成的群組中之可偵測的標記(detectable label)：一放射性標記(radioactive label)、一半抗原標記(hapten label)、一螢光標記(fluorescent label)以及一酵素標記(enzymatic label)。

術語“以抗體為基礎的結合部分”或“抗體”包括免疫球蛋白分子(immunoglobulin molecules)以及免疫球蛋白分子的免疫活性決定位(immunologically active determinants)，例如，含有一個會與IL-8專一性地結合(免疫反應)的抗原結合位址(antigen-binding site)的分子。術語“以抗體為基礎的結合部分”被意欲要包含具任一種同型(isotype)(例如，IgG、IgA、IgM、IgE等等)的所有抗體以及包含它們的亦會與IL-8專一性地反應的片段。

依據本發明，術語“以抗體為基礎的結合部分”或“抗體”包括一捕捉抗體(capture antibody)以及一偵測抗體(detection antibody)。

如此處所用的，術語“捕捉抗體”意指一抗體[不論是單株的、多株的，或是它的一免疫反應片段(immunoreactive fragment)]，它能夠結合一感興趣的抗原(antigen)，並且因而容許藉由一被隨後地施用的抗體來辨識該抗原。該捕捉抗體可被用於一異質性(固相)或均質性(液相)分析法[heterogeneous (solid phase) or homogeneous (solution phase)]

assay]中。較佳地，該捕捉抗體被固定於一固相之上。

如此處所用的，術語“偵測抗體”包括一包含有一可偵測的標記的抗體，該可偵測的標記對於在一樣品中之一或多個感興趣的待測物(analytes)具有專一性[亦即，結合、被結合以，或與之形成一複合物]。該術語亦涵蓋一對於一或多個感興趣的待測物具有專一性的抗體，其中該抗體可被結合以另一個包含有一可偵測的標記的物種。可偵測的標記的實例包括，但不限於：生物素/鏈黴抗生物素蛋白標記(biotin/streptavidin labels)、核酸[例如，寡核苷酸(oligonucleotide)]標記、化學反應標記(chemically reactive labels)、螢光標記、酵素標記、放射性標記，以及它們的組合。

抗體可使用傳統技術而被片段化(fragmented)。因此，術語“該抗體的片段(fragment thereof)”包含一能夠與一特定蛋白質選擇性地反應的抗體分子之經蛋白質水解切斷的或被重組地製備的部分(proteolytically-cleaved or recombinantly-prepared portions)的節段(segments)。該等蛋白質水解的和/或重組型片段的非限制性實例包括Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、dabs以及含有一個藉由一個肽連接子(peptide linker)而被接合的VL與VH領域的單鏈抗體(scFv)。該等scFv's可被共價地或非共價地連結，俾以形成具有兩個或多個結合位址的抗體。

術語“以抗體為基礎的結合部分”包含由抗體以及重組型抗體所構成之多株的、單株的或其他經純化的製備物。

術語“以抗體為基礎的結合部分”進一步被意欲要包含人類化抗體(humanized antibodies)、雙-專一性抗體(bi-specific antibodies)以及具有至少一個衍生自一抗體分子的抗原-結合決定位的嵌合分子(chimeric molecules)。

5 在一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分被可偵測地標記。如此處所用的，“被標記的抗體”包含藉由一可偵測的構件而被標記的抗體而且包含，但不限於：酵素地、放射性地(radioactively)、螢光地(fluorescently)與化學發光地(chemiluminescently)標記的抗體。抗體亦可被標記以一可偵測的標籤，諸如c-Myc、HA、VSV-G、HSV、
10 FLAG、V5或HIS。

在使用以抗體為基礎的結合部分以供偵測IL-8的本發明的方法當中，在一尿液樣品中的IL-8位準與從被可偵測地標記的抗體放射出的信號之強度有相關。

15 在一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分是藉由將抗體結合至一酵素而被可偵測地標記。該酵素，依次地，當被曝露至它的基質，會以一種方式來與該基質反應，因而得以產生一個化學部分(chemical moiety)，它可藉由，例如分光光度計的(spectrophotometric)、螢光標定的
20 (fluorometric)或藉由視覺的方式(visual means)而被偵測。可被用來可偵測地標記本發明的抗體之酵素包含，但不限於：蘋果酸去氫酶(malate dehydrogenase)、葡萄球菌核酸酶(staphylococcal nuclease)、 δ -V-類固醇異構酶(delta-V-steroid isomerase)、酵母乙醇去氫酶(yeast alcohol

dehydrogenase)、 α -甘油磷酸去氫酶(alpha-glycerophosphate dehydrogenase)、丙糖磷酸異構酶(triose phosphate isomerase)、辣根過氧化酶(horseradish peroxidase)、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)、天冬醯胺酸酶(asparaginase)、葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)、 β -半乳糖酶(β -galactosidase)、核糖核酸酶(ribonuclease)、尿素酶(urease)、觸酶(catalase)、葡萄糖-VI-磷酸去氫酶(glucose-VI-phosphate dehydrogenase)、葡萄糖澱粉酶(glucoamylase)以及乙醯膽鹼酯酶(acetylcholinesterase)。化學發光是另一種可被用來偵測一以抗體為基礎的結合部分的方法。

10 偵測亦可使用各種不同的其他免疫分析法之任一者而被完成。例如，藉由放射性地標記一抗體，有可能經由放射免疫分析法(radioimmune assays)的使用來偵測該抗體。放射性同位素(radioactive isotope)可以藉由諸如使用一伽瑪計數器(gamma counter)或一閃爍計數器(scintillation counter)或藉由自動放射顯影術(autoradiography)之方式而被偵測。對於本發明之目的而言特別有用的同位素是 ^3H 、 ^{31}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 以及 ^{125}I 。

15 亦有可能以一螢光化合物來標記一抗體。當被螢光地標記的抗體被曝露至具有適當的波長之光，它的存在可因螢光之故而被偵測到。居於最經常被使用的螢光標記化合物之中的是CYE染料(CYE dyes)、螢光素異硫氰酸鹽(fluorescein isothiocyanate)、玫瑰紅(rhodamine)、藻紅素

(phycoerythrin)、藻藍蛋白(phycocyanin)、別藻藍蛋白(allophycocyanin)、鄰苯二甲醛(o-phthaldehyde)以及螢胺(fluorescamine)。一抗體亦可使用螢光放射金屬(諸如¹⁵²Eu或其他的鑭系元素)而被可偵測地標記。這些金屬可使用金

屬 - 蟄合基團 [諸如二乙三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA)或乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)]而被附接至抗體。

一抗體亦可藉由將它偶合至一化學發光化合物而被可偵測地標記。化學發光-抗體的存在接而藉由偵測在一化學反應的過程當中所出現的發光之存在而被測定。特別有用的化學發光標記化合物的實例是發光胺(luminol)、蟲螢光素(luciferin)、異發光胺(isoluminol)、theromatic 吡啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑(imidazole)、吡啶鹽(acridinium salt)以及草酸酯(oxalate ester)。

依據本發明，術語“一預設標準”可表示有關於健康個體之IL-8的經肌酸酐標準化的位準的一正常範圍、一正常數值或一正常截斷值(cutoff value)(如藉由一選定的方法而被測定到的)。在正常的個體與具有尿石症的病患之間的一個適當的IL-8位準的截斷值可以藉由那些熟習此技藝者而被容易地測定。較佳地，正常的個體具有正常的尿分析(urinalysis)、正常的身體檢查以及無已知的尿石症病史，並且尿液的C-反應蛋白質(C-reactive protein, CRP)位準不大於0.1 mg/L。此外，一人類個體的IL-8的經肌酸酐標準化的位準(如在一先前的檢查中而被偵測到的)亦可被用作為針

對該人類個體的預設標準。

在本發明的一個較佳具體例中，IL-8位準的預設標準藉由使用BDTM Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA)的多重免疫分析法而被測量，產生一為 6.2 pg/mg 肌酸酐的數值作為 IL-8 位準的經肌酸酐標準化的截斷值。作為一另擇方式，IL-8 位準的預設標準可以是正常個體的 IL-8 位準(經肌酸酐標準化)的一個平均並且被表示為平均值±2 標準偏差 (standard deviations, SDs)。

【實施方式】

10 較佳實施例之詳細說明

實施例：

本發明將參照下面的實施例來作更詳細的說明，該等實施例僅為了例示說明之目的而被提供，而非意欲用來限制本發明的範疇。

15 A. 材料與實驗處理程序：

研究主旨(Study Subjects)

在本發明的研究中的 70 個個體是使用一由高雄醫學大學的人體試驗委員會 (Institutional Review Board) 所認可的操作程序而被募集。此外，本發明中所研究的人類個體的每一者有就他們的尿液樣品之捐贈而取得經告知的同意 (informed consent)。來自於泌尿科的病患被登記，並且對照組來自於在高雄醫學大學附設醫院的健康檢查中心。在本發明的研究中所募集的病患在收集尿液的時候需要尿結石的放射顯影以及超音波顯影的文件 (radiographic and

echographic documentation)。排除標準(exclusion criteria)包括感染(infection)、副甲狀腺高能症(hyperparathyroidism)、高尿酸血症(hyperuricemia)以及非-鈣性腎結石(non-calcium renal stones)的存在。對照組具有正常的尿分析(urinalysis)、正常的身體檢查並且無已知的尿石症病史。為了排除具有無症狀性感染的尿液發炎(subclinical infectious urinary inflammation)的個體，那些尿液的C-反應蛋白質(CRP)位準是大於0.1 mg/L的病患以及對照組從本發明的研究中被排除。

10 具有尿石症的病患的臨床特徵被顯示於表1中。

表1. 有關於在本發明的研究中所檢測的對照組個體以及尿石症病患的臨床資訊

	正常對照組	尿石症
病例的數目	38	32
年齡 ^a (範圍)(歲數)	48 ± 16 (18-74)	55 ± 15 (26-80)
性別(女性/男性)	11/27	8/24
單一的/多數的結石	NA ^b	19/13
單側的/雙側的	NA	23/9
腎臟(kidney)中的結石(%)	NA	38
輸尿管(ureter)中的結石(%)	NA	75
膀胱(bladder)中的結石(%)	NA	9
復發(recurrent)(%)	NA	28

^a：平均值±標準偏差

^b：NA，不適用(not applicable)

15 尿液收集以及生物標記測定

來自於健康自願者以及病患的每一者的中段早晨尿液被保存在4°C下，並且以1,000 g予以離心歷時10分鐘。所形成的上清液被區分為整分部分(aliquots)並且被儲存在-70°C

下。

在本發明的研究中，發炎性細胞激素以及趨化激素是藉由多重免疫分析法而被偵測。發炎性細胞激素以及趨化激素的濃度藉由 BDTM Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA)而被測量，該BDTM Cytometric Bead Array含有被染色而在大約650 nm下會展現出不同的螢光強度的微粒子(microparticles)。各個粒子[捕捉珠粒(capture bead)]被包覆以針對在本發明的研究中所檢測的細胞激素(IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 或IL-12p70)或趨化激素(IL-8、RANTES、Mig、MCP-1或IP-10)中之一者的單株抗體。該等細胞激素以及趨化激素(在被結合至它們各自的捕捉珠粒之後)是使用一具有被綴合以藻紅素(phycoerythrin, PE)(它在585 nm下放射)之對應抗體的混合物而被直接地偵測到。

在該實驗中，一具有捕捉珠粒的混合物被培育以標準品(重組型細胞激素以及趨化激素)或試驗樣品，繼而依據製造商的操作指南藉由經PE綴合的偵測抗體(PE-conjugated detection antibodies)來形成夾心式複合物(sandwich complexes)。之後，該反應混合物在一FACScan流式細胞儀(flow cytometer)中被進行，並且使用Becton Dickinson Cytometric Bead Array軟體(software)予以分析。一重組型細胞激素或趨化激素的濃度與它在585 nm下所偵測到之對應的中間螢光強度(median fluorescence intensity)成比例。

在一試驗樣品中的一細胞激素或趨化激素的濃度是根

據它的對應的重組型細胞激素或趨化激素的標準曲線而被測定。用於偵測各個蛋白質的最小閾值(minimum thresholds)(如在本發明的研究中所檢測到的)是如下列：
 IL-1 β : 3.6 pg/mL ; IL-6 : 2.5 pg/mL ; IL-10 : 3.3 pg/mL ;
 5 TNF- α : 3.7 pg/mL ; IL-12p70 : 2 pg/mL ; IL-8 : 0.2 pg/mL ;
 RANTES : 1 pg/mL ; Mig : 2.5 pg/mL ; MCP-1 : 3 pg/mL ;
 以及IP-10 : 3 pg/mL 。

統計(Statistics)

為了減低稀釋的影響，有關於各個個體的細胞激素以及趨化激素的濃度是藉由肌酸酐位準而被標準化，並且接而被表示為平均值± SD (pg/mg肌酸酐)。此外，在病患以及對照組中的各個生物標記的分佈被個別地檢測。年齡以及性別對於這些生物標記的影響亦被評估。有關於各個生物標記在受試者操作特徵(ROC)曲線之下的區域被計算出來並且被用作為一種用於測定何種生物標記具有一較佳的診斷力而可以區別病患與對照組的指數(index)。

申請人亦藉由卡方試驗(chi-square test)將生物標記位準對分(dichotomized)俾以評估它們的位準在病患以及對照組之間的差異。用以對分(dichotomize)各個細胞激素以及趨化激素的截斷值是從對照組所計算出的平均值加2 SDs (mean plus 2 SDs)。顯著性(significance)被定義為一雙邊 p 值 < 0.05 (two-side p value < 0.05)。

B. 結果：

使用流式細胞小球陣列(cytometric bead arrays)的趨化

激素位準的代表性數據被顯示於圖1中。一個離群值(outlier)被發現於具有一大於5個群-特異性SDs (group-specific SDs)的IL-8/CXCL8位準的對照組中，而因此它在IL-8/CXCL8 (275.46 pg/mg肌酸酐)方面的數據不被分析。

5 各個生物標記之經肌酸酐標準化的數值的範圍被顯示於表2中。IL-12p70、IL-10以及TNF- α 的平均值位準是低於在病患以及對照組這兩者中的可偵測的數值。IL-6位準是低於在對照組中的可偵測的閾值(threshold)。對於IL-8 (區域= 0.84, $p < 0.001$)、Mig (區域= 0.76, $p < 0.001$)以及
10 RANTES (區域= 0.66, $p = 0.024$)的經肌酸酐標準化的位準而言，ROC區域是顯著的。

表2. 在本發明的研究中所檢測的各個細胞激素以及趨化激素的平均值、標準偏差以及範圍

	尿石症	對照組
	平均值 ^b ± SD (範圍)	平均值 ^b ± SD (範圍)
IL-8/CXCL8 ^a	131.94 ± 242.04 (0~1157.97)	7.97 ± 8.93 (0~33.82)
RANTES/CCL5	17.59 ± 30.19 (0~144.78)	4.69 ± 3.06 (0~14.04)
Mig/CXCL9	239.30 ± 218.81 (0~995.59)	177.57 ± 149.03 (0~665.19)
MCP-1/CCL2	739.16 ± 1021.02 (0~3504.28)	146.73 ± 95.66 (30.35~500.83)
IP-10/CXCL10	681.05 ± 765.10 (0~3236.31)	257.09 ± 244.09 (0~904.06)
IL-1 β	11.11 ± 19.54 (0~79.17)	4.59 ± 10.43 (0~44.15)
IL-6	13.26 ± 22.34 (0~91.72)	1.61 ± 2.25 (0~7.22)
IL-10	低於可偵測的位準	低於可偵測的位準
TNF- α	低於可偵測的位準	低於可偵測的位準
IL-12p70	低於可偵測的位準	低於可偵測的位準

^a：離群值被移除

^b： pg/mg 肌酸酐

5 根據ROC曲線，有關於IL-8之經肌酸酐標準化的位準的截斷點(cutoff point)是6.2 pg/mg肌酸酐。就其本身而論，經肌酸酐標準化的IL-8位準 \geq 6.2 pg/mg肌酸酐(creatinine-normalized IL-8 levels \geq 6.2 pg/mg creatinine)將表示尿結石的存在。依據這個IL-8的截斷點，診斷的靈敏度以及專一性可分別地達到91%以及68%。其他的方法是使用平均值加2 SDs (mean plus 2 SDs)的一任意截斷點(arbitrary cutoff point)而將每一個生物標記對分。使用卡方試驗，病患體內的IL-8、RANTES、MCP-1、IP-10以及IL-6相較於對照組被顯著地升高(圖2)。

10

從比較具有與不具有尿結石的一先前病史的病患之進一步分析中，申請人並未發現：復發的病例較首次發病的病患(first-attack patients)具有較高的生物標記位準。此外，生物標記位準與單一的或多數的結石(single or multiple stones)無涉。

C. 討論：

申請人的研究揭示：在具有尿石症的病患體內的細胞激素以及趨化激素的尿液濃度是顯著地高於那些在正常個體內所具者。顯著的生物標記包括IL-8、RANTES、IL-6、MCP-1、Mig以及IP-10，在其中IL-8是用於區別病患與對照組的最靈敏的標記。所獲得的數據暗示一個介於尿結石以及在尿道中的發炎之間的連結。雖然不清楚發炎是否會促成尿結石的形成或者反之亦然，申請人的發現仍可以提供一用於偵測高風險個體的工具。

發炎的徵兆已與尿道中結石的存在有關聯。證據表示：因為尿石症而來的發炎是不同於由感染因子(infectious agents)所引起的發炎。

經由Rhee與同事們的研究證實：在細菌感染中發炎性細胞激素(諸如IL-1 β 、IL-1 α 以及IL-6)的尿液位準被顯著地升高；然而，在尿石症中僅IL-6位準被增高(Rhee *et al.* (1998)，如上述(*supra*)。申請人在本發明的研究中有一個類似的發現，其中根據臨床的證據或CRP的尿液位準大於0.1 mg/L之具有感染的病患被排除。申請人的結果顯示：與對照組個體相較之下，在具有尿石症的病患的尿液中的數

個發炎性趨化激素以及IL-6是顯著較高的，但是IL-1 β 的位準在病患以及正常對照組之間並無不同。這個發現暗示：尿石症可能與慢性、無症狀性的非-感染性發炎(chronic subclinical non-infectious inflammation)有關聯。申請人的數據顯示：TNF- α 、IL-10以及IL-12p70的位準在病患以及正常對照組這兩者之中是偵測不到的。這個發現可能是因為在尿石症中這些生物標記的生成沒有被增高。然而，亦可能的是：這些細胞激素主要地作為局部的發炎性介質(local inflammatory mediators)，或者他們被太過於稀釋而在尿液中無法偵測得到。

至於在本發明的研究中所監測的趨化激素，它們屬於誘導型趨化激素的亞群(subset)，該等趨化激素在發炎性反應的期間是被上升-調節的(up-regulated)(Gerd Müller *et al.* (002), *Journal of Leukocyte Biology*, 72:1-8)。誘導型趨化激素的主要功能是要選擇性地控制白血球(leukocytes)對於發炎組織的趨化性(chemotaxis)。因此，多數的誘導型趨化激素的尿液位準是高於那些甚至在正常個體體內的發炎性細胞激素所具者(如在表2中所顯示的)。因此，雖然申請人的研究並未證實被增高的TNF- α 、IL-10以及IL-12p70的位準，它們仍可能被涉及於尿石症的非-感染性發炎。

因為在腎臟內的細胞的複雜性(complexity)以及多樣性(diversity)，難以檢測何種細胞在活體內(*in vivo*)對於高酸草醯脲的腎臟而言在免疫細胞的募集(recruitment)上扮演一個主要的角色。另一方面，活體外細胞培養研究已經

提供重要的資訊。先前研究已經顯示：管狀上皮細胞(tubular epithelial cells)是誘導型趨化激素(包括IL-8、RANTES以及MCP-1)的一個豐富的來源(Tohru Umekawa *et al.* (2002),如上述; Stephan Segerer *et al.* (2000), *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:152-176)。腎結石可能含有可估計數量的內毒素(endotoxin)，並且可經由TLR4來刺激上皮細胞分泌趨化激素(I. McAleer *et al.* (2003), *Journal of Urology*, 169(5):1813-1814)。事實上，腎小管細胞(renal tubular cells)可表現數種類型的TLRs，包括TLR1、2、3、4以及6，但是不包括TLR5以及9。藉由腎小管細胞來誘導RANTES以及MCP-1已經被證實是在TLR4以及TLR2的刺激之後(Naotake Tsuboi *et al.* (2002), *J. Immunol.*, 169:2026-2033)。然而，管狀上皮細胞以及腎小管細胞在趨化激素生成上的活體內的角色應該被進一步地檢測。

申請人的數據證實：具有尿石症的病患體內的IL-8、RANTES、Mig、MCP-1、IP-10以及IL-6尿液位準相較於對照組個體有一顯著的增高。這些趨化激素以及細胞激素可以從管狀上皮細胞與腎小管細胞，以及特定的免疫細胞亞群中被分泌出。申請人推測：樹突細胞、NK細胞、單核細胞(monocytes)、T細胞以及嗜中性白血球可能被涉及於尿石症的非-感染性發炎。例如，RANTES是一種針對未成熟的樹突細胞以及NK細胞的趨化劑(chemoattractant)。未成熟的樹突細胞亦可產生對於TLR2以及TLR4的促效劑(agonists)有反應的RANTES、IP-10、IL-8、MIP-1 α 以及MIP-1 β

(Fabio Re and Jack L. Strominger (2001), 如上述)。此外，由NK細胞所分泌的IFN- γ 亦可誘導IP-10以及Mig從常駐組織細胞(resident tissue cells)中的生成。IP-10以及Mig接而將引導被活化的T細胞返回發炎組織中(Thais P. Salazar-Mather *et al.* (2000), 如上述)。這些從管狀上皮細胞以及樹突細胞而來的趨化激素的早期生成對於在腎臟中形成(shaping)免疫反應而言是必要的。藉由內生性危險信號(endogenous danger signals)[諸如創傷(trauma)或缺氧(hypoxia)]所誘導的IP-10的早期表現被發現對於T以及NK細胞的匯集(influx)而言是重要的(Wayne W. Hancock *et al.* (2001), *J. Exp. Med.*, 193:975-980)。IL-8因為針對一發炎性位址(inflammatory site)的嗜中性白血球募集(neutrophil recruitment)而聞名。MCP-1不僅募集單核細胞而且還有記憶T細胞(memory T cells)以及NK細胞，俾以調節前發炎性效應(proinflammatory effects)(Christine Daly and Barrett J. Rollins (2003), *Microcirculation*, 10:247-257)。MCP-1亦可刺激管狀上皮細胞來分泌IL-6以及表現細胞間黏著分子-1(intercellular adhesion molecule-1)(Christiane Viedt *et al.* (2002), *J Am Soc Nephrol.*, 13:1534-1547)。因此，由結石所誘導的腎損害(renal damage)可以起始(initiate)一種“趨化激素至細胞激素至趨化激素”級聯(“chemokine to cytokine to chemokine” cascade)，它在尿石症的疾病過程中可能扮演一個重要的角色。

本發明的研究顯示：尿液的IL-8是一種用於偵測尿石

症的潛在的生物標記。雖然本研究無法說明被升高的IL-8位準是尿石症的病因或結果，它仍具有成為一篩選生物標記(screening biomarker)的潛力。一個對於高風險個體的追蹤研究(follow-up study)可以就IL-8在尿石症的發展上的角色提供一個較佳的見解。

於本案說明書內所引述的所有文件以及當中所描述的參考資料是以它們的整體在此被併入本案以作為參考資料。若有所衝突的話，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

雖然本發明已參照它的特定具體例而被描述，將被瞭解的是：它可以作進一步的修飾，並且本件申請案被意欲要涵蓋本發明的任何變化、使用或改造，它們大抵上遵循本發明的原則並且包含不同於落在本發明所屬技藝內之當今慣用技術的改變，而可被應用於如上文中所描述的基本特徵，以及落在下面隨文檢附的申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖1顯示藉由流式細胞小球陣列(cytometric bead arrays)從健康的對照組(A區)以及具有尿石症的病患(B區)中所偵測到的趨化激素位準的代表性數據，其中代表不同的趨化激素(IL-8、RANTES、Mig、MCP-1以及IP-10)的點圖(dot plots)[黃-A (585 nm)相對於紅-A (650 nm)]是藉由沿著y-軸的5個不連續的微粒子染色強度(discrete microparticle dye intensities)而被表示在圖中；以及x-軸(它顯示有關於樣品螢光強度的數值)反映出各種不同的生物標記的濃度；以及

圖2顯示在具有尿石症的病患(Δ)以及正常個體(\circ)體內的尿液的趨化激素以及細胞激素濃度的一個比較，其中點(spots)代表經肌酸酐調整的趨化激素/細胞激素濃度的數值，而水平虛線表示各個趨化激素或細胞激素的正常範圍截斷[被表示為對照組的平均值加2 SDs (mean plus 2 SDs)](經肌酸酐調整的截斷值：對於IL-8而言是25.83 pg/mg肌酸酐、對於RANTES而言是10.81 pg/mg肌酸酐、對於MCP-1而言是475.63 pg/mg肌酸酐、對於IP-10而言是745.27 pg/mg肌酸酐，以及對於IL-6而言是6.11 pg/mg肌酸酐)。在病患以及對照組之間的差異藉由卡方試驗(chi-square test)而被評估。

【主要元件符號說明】

(無)

十、申請專利範圍：

1. 一種用於偵測或初步篩選一人類個體體內的尿石症的方法，其包含有：

5 偵測一取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；

藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及

10 令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預設標準相比較；

其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵。

2. 如申請專利範圍第1項的方法，其中該IL-8位準是藉由

15 使用下列方法學之任一者來定量IL-8而被偵測到：多重免疫分析法、酵素結合免疫吸附分析法、放射免疫分析法以及免疫放射量測定分析法。

3. 如申請專利範圍第2項的方法，其中定量IL-8是使用一

會專一性地結合IL-8之以抗體為基礎的結合部分而被進行。

- 20 4. 如申請專利範圍第3項的方法，其中該以抗體為基礎的結合部分是一抗體。

5. 如申請專利範圍第3項的方法，其中該以抗體為基礎的結合部分被標記以一可偵測的標記。

6. 如申請專利範圍第5項的方法，其中該標記是選自於下

列所構成的群組：一放射性標記、一半抗原標記、一螢光標記以及一酵素標記。

7. 如申請專利範圍第1項的方法，其中偵測該IL-8位準是藉由多重免疫分析法而被進行，並且該IL-8的經肌酸酐標準化的截斷值被測定為6.2 pg/mg肌酸酐。
8. 一種用於監測一人類個體體內的尿石症的方法，其包含有：

 偵測定期地取自於一被懷疑具有尿石症的人類個體的尿液樣品中的IL-8位準以及肌酸酐位準；

 藉由相對於所偵測到的肌酸酐位準來標準化所偵測到的IL-8位準而獲得一尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準；以及

 令該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準與一預設標準相比較；

 其中該尿液樣品中的經肌酸酐標準化的IL-8位準相較於該預設標準的一升高是為有尿石症的指徵。

9. 如申請專利範圍第8項的方法，其中該IL-8位準是藉由使用下列方法學之任一者來定量IL-8而被偵測到：多重免疫分析法、酵素結合免疫吸附分析法、放射免疫分析法以及免疫放射量測定分析法。

10. 如申請專利範圍第9項的方法，其中定量IL-8是使用一會專一性地結合IL-8之以抗體為基礎的結合部分而被進行。

11. 如申請專利範圍第10項的方法，其中該以抗體為基礎的

結合部分是一抗體。

12. 如申請專利範圍第10項的方法，其中該以抗體為基礎的結合部分被標記以一可偵測的標記。
13. 如申請專利範圍第12項的方法，其中該標記是選自於下列所構成的群組：一放射性標記、一半抗原標記、一螢光標記以及一酵素標記。
14. 如申請專利範圍第8項的方法，其中偵測該IL-8位準是藉由多重免疫分析法而被進行，並且該IL-8的經肌酸酐標準化的截斷值被測定為6.2 pg/mg肌酸酐。

10

十一、圖式：

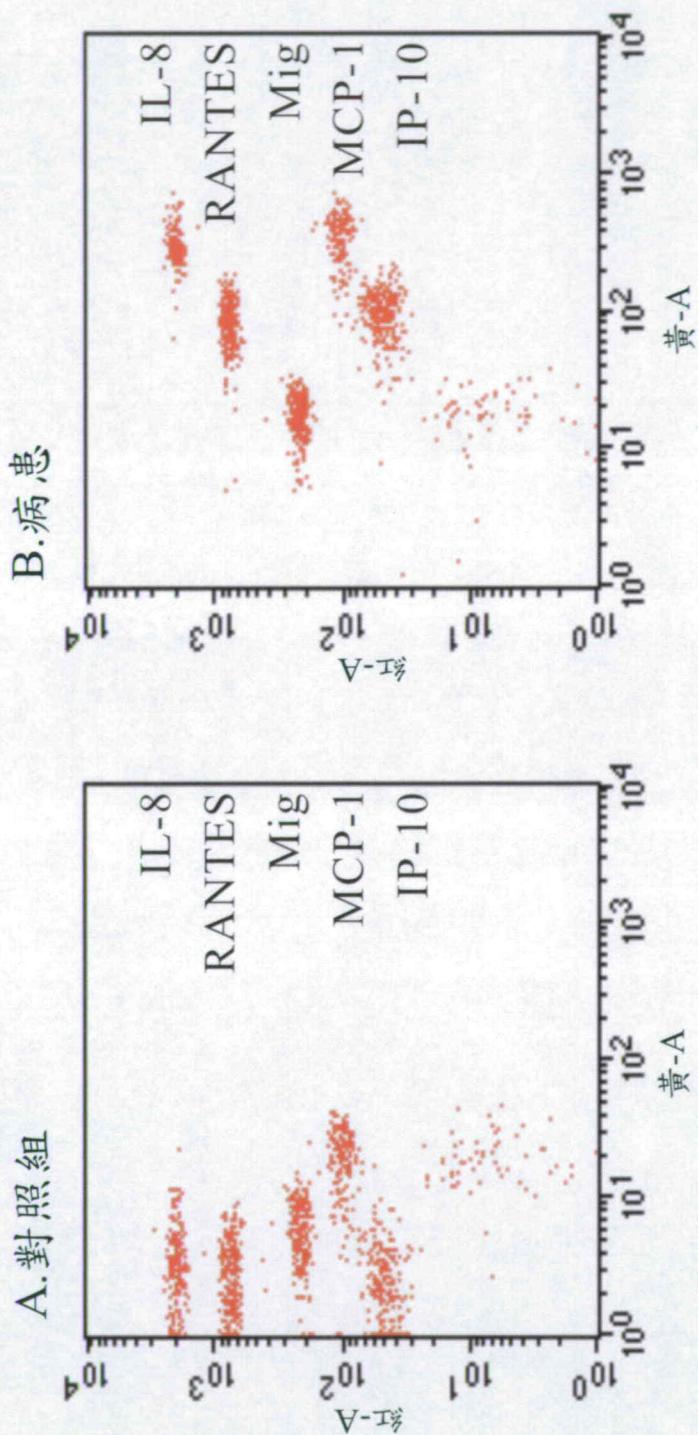


圖 1

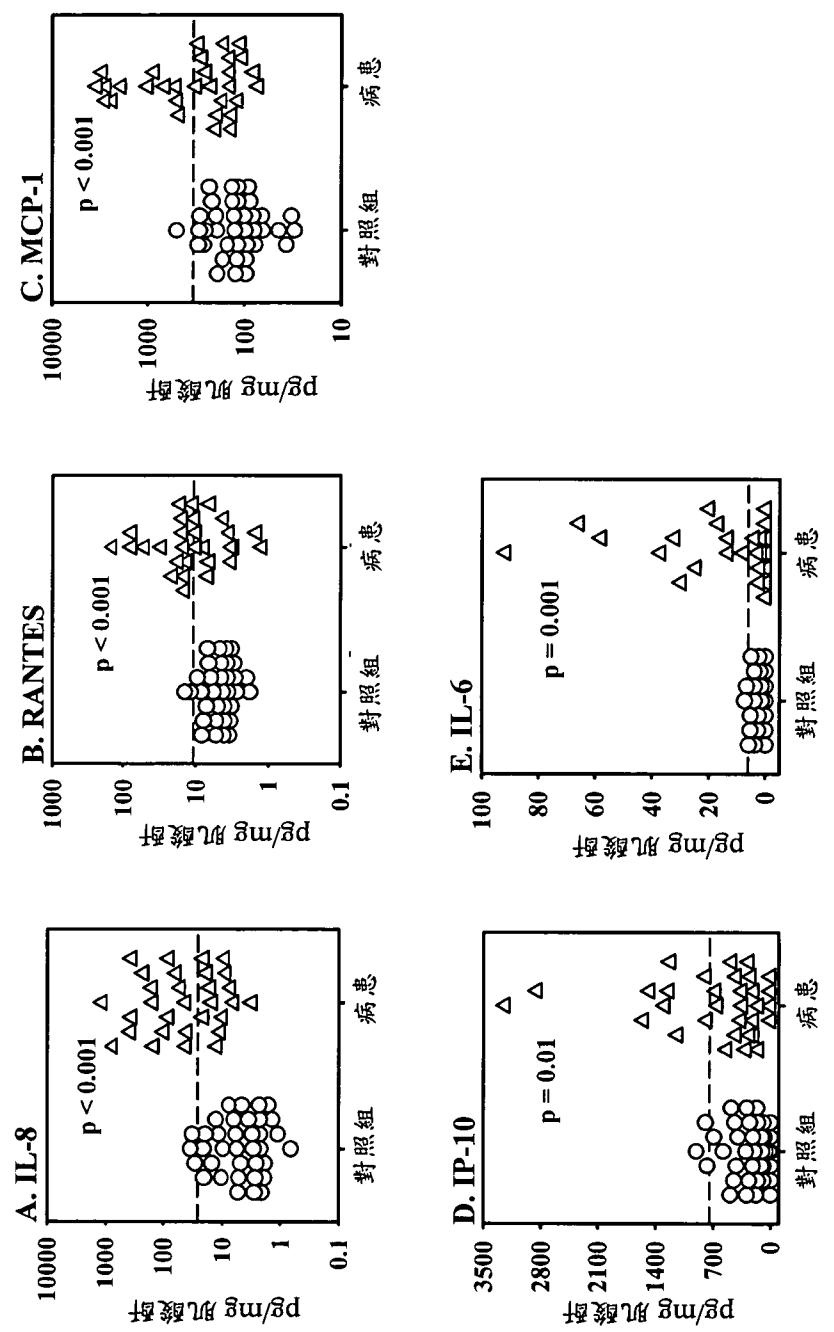


圖 2