



(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 I420106 B

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：100144163

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 01 日

(51)Int. Cl. : G01N33/68 (2006.01)

G01N33/50 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)  
高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：李明義 (TW)；邱式鴻 (TW)；陳文仁 (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

(56)參考文獻：

TW 201120218A1

WO 2011/083145A1

J. W. Lee et al., "Elevated Milk Soluble CD14 in Bovine Mammary  
Glands Challenged with Escherichia coli Lipopolysaccharide",  
Journal of Dairy Science, 2003, Vol. 86, No. 7, p.2382~2389.

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：1 共 0 頁

(54)名稱

可溶性 CD14 作為一偵測冠狀動脈疾病的生物標記

(57)摘要

本發明揭示一種用於偵測、初步篩選或監測一人類個體體內的冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD) 的方法，其中若該人類個體的尿液樣品中的可溶性 CD14 (soluble CD14, sCD14) 位準高於一標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

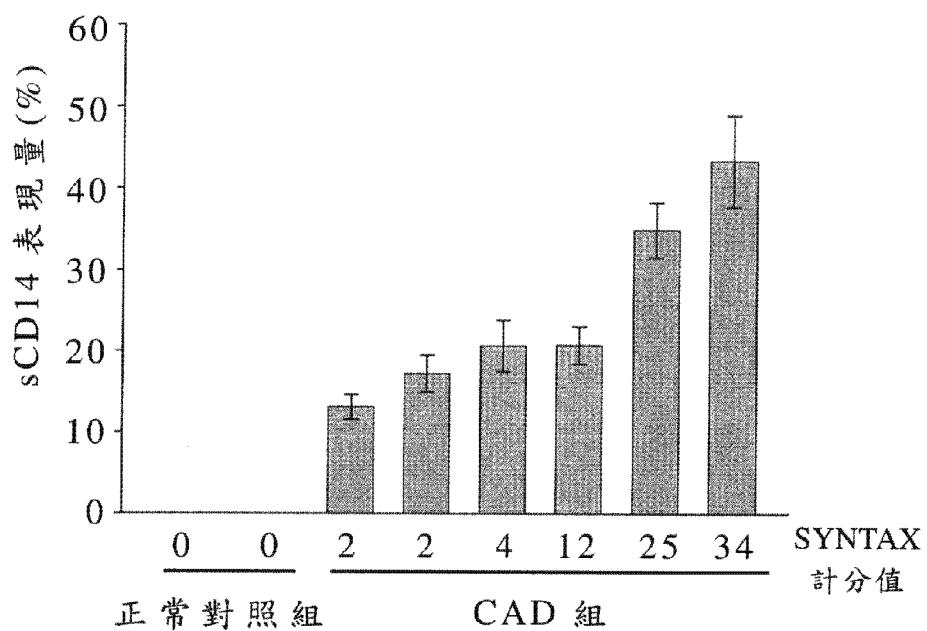


圖 1

**公告本**  
**發明專利說明書**

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 100144163

G01N 33/68 (2006.01)

※申請日： 100. 12. 01

※IPC 分類：

G01N 33/57 (2006.01)

### 一、發明名稱：(中文/英文)

可溶性 CD14 作為一偵測冠狀動脈疾病的生物標記

### 二、中文發明摘要：

本發明揭示一種用於偵測、初步篩選或監測一人類個體體內的冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD) 的方法，其中若該人類個體的尿液樣品中的可溶性 CD14 (soluble CD14, sCD14) 位準高於一標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

### 三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（1）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於尿液中的可溶性 CD14 (soluble CD14, sCD14) 作為一種用於偵測冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD) 的生物標記 (biomarker)。特別地，本發明提供一種用於偵測、初步篩選或監測一人類個體體內的冠狀動脈疾病的方法，其中若該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準高於一標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

### 【先前技術】

冠狀動脈疾病 [亦被稱為冠狀心臟疾病 (coronary heart disease, CHD) 或動脈硬化性心臟疾病 (atherosclerotic heart disease)] 是一種由冠狀動脈的狹窄 (stenosis) 或阻塞 (obstruction) 所造成的心血管疾病 (cardiovascular disease)，並且是現今造成全球性的人類死亡的主要原因之一。帶有冠狀動脈疾病的病患可能會出現心肌缺氧 (myocardial ischemia)、心肌梗塞 (myocardial infarction)、心絞痛 (angina pectoris)、缺血性心肌病變 (ischemic cardiomyopathy)、鬱血性心衰竭 (congestive heart failure) 以及動脈瘤形成 (aneurysm formation) 等症狀 (symptoms)，而他們通常都是在症狀發病 (onset of symptoms) 之後才被診斷出。因此，本技術領域的研究人員皆致力於尋找一個可信賴的生物標記以供用於冠狀動脈疾病的診斷 (diagnosis)、治療 (treatment) 以及病程的監測 (monitoring of the disease course)。

已有研究顯示，存在於血清(serum)或血漿(plasma)中的蛋白質，例如脂質運載蛋白-型前列素D合成酶(lipocalin-type prostaglandin D synthase)、單核球趨化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1)、經氧化的低密度脂蛋白/ $\beta$ 2-糖蛋白I複合物[Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)/beta(2)-glycoprotein I (beta2GPI) complexes]以及嗜酸性球陽離子蛋白(eosinophil cationic protein)等，可供用於檢測冠狀動脈疾病(Inoue T. et al. (2008), *Atherosclerosis*, 201:385-391; Harsimran K. et al. (2009), *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 6:288-290; Greco T.P. et al. (2010), *Am. J. Clin. Pathol.*, 133:737-743; Niccoli G. et al. (2010), *Atherosclerosis*, 211:606-611)。

另有研究顯示，存在於尿液中的蛋白質，例如基質金屬蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、金屬蛋白酶的組織抑制劑-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)以及8-異前列腺素(8-isoprostan)，可被用來診斷冠狀動脈疾病(P.J. Fitzsimmons et al. (2007), *Atherosclerosis*, 194:196-203; I. Basarici et al. (2008), *Acta Cardiol.*, 63:415-422)。

CD16是一種可結合至IgG抗體的Fc部分(Fc portion)的Fc受體(Fc receptor)，主要被發現存在於天然殺手細胞(natural killer cells)、單核球(monocytes)以及巨噬細胞(macrophages)的細胞表面上。而CD14是一種與先天性免疫系統(innate immune system)有關的糖蛋白(glycoprotein)，它

可作為一用於偵測脂多醣(lipopolysaccharides, LPS)的共受體(co-receptor)。CD14 在人體內主要會以下列 2 種形式而存在：

- (1) 膜-結合 CD14 (membrane-bound CD14, mCD14)：它是一種分子量大約為 55 kDa 的糖基磷脂醯肌醇(GPI)-連結的蛋白質 [glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein]，主要是藉由 GPI 尾端(GPI tail)而被錨定在骨髓母細胞(myeloid cell)[諸如單核球、巨噬細胞、嗜中性球(neutrophils)以及多形核吞噬細胞(polymorphonuclear phagocytes)]的細胞表面上；以及
- (2) 可溶性 CD14 (soluble CD14, sCD14)：它與 mCD14 具有相同的胺基酸序列，但是缺少 GPI 尾端，主要可藉由在單核球或肝細胞(hepatocyte)中 CD14 基因的表現而被生成，並且在偶合(coupling)至 GPI 尾端之前直接被分泌至細胞外(分子量大約為 56 kDa)；或者亦可藉由磷脂酶(phospholipase)或蛋白酶(protease)對單核球表面上的 mCD14 進行切割(digestion)而從 GPI 尾端被釋放出(分子量大約為 48 kDa)。因此，sCD14 主要是存在於血漿(plasma)與血清(serum)中。

$CD14^+CD16^+$ 單核球( $CD14^+CD16^+$  monocyte)是一種前發炎性單核球(proinflammatory monocyte)，它們具有一增高的能力來生成前發炎性細胞激素(proinflammatory cytokines)[諸如腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ )]。有研究顯示，帶有冠狀動脈疾病(CAD)的病患具有一增

高的  $CD14^+CD16^+$  單核球的數目，而增高的  $CD14^+CD16^+$  單核球的數目與血清中的 TNF- $\alpha$  位準(level)有關聯。因此， $CD14^+CD16^+$  單核球被認為在冠狀動脈粥樣硬化(coronary atherosclerosis)的疾病發展(disease development)上扮演一個重要的角色(A. Schlitt *et al.* (2004), *Thromb. Haemost.*, 92:419-24)。

WO 2011/083145 A1 揭示外泌體(exosome)中的 CD14 可作為一種用於預測一心血管現象(cardiovascular event)[諸如，致命或非致命的中風(stroke)、冠狀動脈疾病、周邊動脈疾病(peripheral arterial disease)或心衰竭(heart failure)等]的生物標記，其中該外泌體可以分離自血漿、血清、血液以及尿液等。特別地，在該篇專利公開案的實施例中主要是以血漿作為檢測樣品，而實驗結果顯示：該生物標記在組合以傳統的心血管風險因子(cardiovascular risk factors)[諸如膽固醇(cholesterol)、收縮血壓(systolic blood pressure)、周邊動脈疾病的病史(history)以及冠狀動脈疾病的病史等]後，所測得的 ROC 曲線下面積(area under the ROC curve, AUC)相較於單獨使用該等心血管風險因子所測得者具有一增加的情形。

有研究顯示，血清或血漿中的 sCD14 可被用來作為一種用於偵測發炎性疾病[諸如敗血症(sepsis)、類風溼性關節炎(rheumatoid arthritis)、全身性紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus)以及川崎病(kawasaki disease, KD)]的生物標記(G. Horneff *et al.* (1993), *Clin. Exp. Immunol.*, 91:207-213;

W.A. Nockher *et al.* (1994), *Clin. Exp. Immunol.*, 96:15-19; S. Takeshita *et al.* (2000), *Clin. Exp. Immunol.*, 119:376-381)。

此外，R.G. TANG 等人以及 J.W. ZHU 與 C.Y. LIU 報導：血清中的 sCD14 位準與冠狀動脈疾病的嚴重性以及疾病過程(disease process)具有密切的相關性，因而可作為一用於診斷冠狀動脈疾病的生物標記(R.G. TANG *et al.* (2007), *Chin J. Crit. Care Med.*, 27:326-328; J.W. ZHU and C.Y. LIU (2008), *Acta Academiae Medical Qingdao Universitatis*, 44:156-157, 161)。

相較於上述文獻報導是以血清樣品來偵測冠狀動脈疾病，申請人發現：與血清中的 sCD14 相較之下，尿液中的 sCD14 更適合作為一種用於偵測冠狀動脈疾病的生物標記，並且對於冠狀動脈疾病的診斷具有更好的專一性(specificity)以及靈敏度(sensitivity)。

### 【發明內容】

#### 發明概要

於是，在第一個方面，本發明提供一種用於偵測或初步篩選一人類個體體內的冠狀動脈疾病的方法，其包含有：

偵測一取自於該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準；以及

令該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準與一標準值相比較，

其中若該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準高於該標準值

，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

在第二個方面，本發明提供一種用於監測一人類個體體內的冠狀動脈疾病的方法，其包含有：

偵測一定期地取自於該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準；以及

令該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準與一標準值相比較，

其中若該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準高於該標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯。

#### 發明的詳細說明

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：在台灣或任何其他国家中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

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。

除非另外有所定義，在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。一熟悉本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。

如本文中所用的，術語“冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD)”與術語“冠狀心臟疾病 (coronary heart disease, CHD)”或“動脈硬化性心臟疾病 (atherosclerotic heart disease)”可被交替地使用，並且意指一種由冠狀動脈的阻塞所造成的心血管疾病。由冠狀動脈疾病所引起的臨床徵兆 (clinical signs) 與症狀 (symptoms) 包括，但不限於：心肌缺氧 (myocardial ischemia)、心肌梗塞 (myocardial infarction)、心絞痛 (angina pectoris)、缺血性心肌病變 (ischemic cardiomyopathy)、鬱血性心衰竭 (congestive heart failure) 以及動脈瘤形成 (aneurysm formation)。

相較於藉由使用針頭並以侵入性 (invasive) 的方式而被收集的血清樣品，尿液樣品能以非侵入性 (non-invasive) 的方式而被大量地收集，因而被認為是一個較佳且方便的檢測樣品。於本發明中，申請人同時地比較在帶有冠狀動脈疾病 (CAD) 的病患以及正常個體之間的早晨中段尿液檢體 (morning midstream urine specimens) 或血清檢體 (serum specimens) 中的 sCD14 位準。申請人意外地發現到：CAD 病患的尿液中的 sCD14 位準相較於正常個體所具者被顯著地增高，但是血清中的 sCD14 位準在 CAD 病患與正常個體之間並無顯著地差異。申請人進一步使用受試者操作特徵 (ROC) 曲線分析 [receiver operating characteristics (ROC) curve analysis] 而發現到：關於尿液 sCD14 位準的截斷值 (cutoff value) 是  $3.51 \mu\text{g/mL}$ 。根據此截斷值，CAD 診斷的靈敏度以及專一性可分別地達至 84% 以及 70%。

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冠狀動脈疾病的方法，其包含有：

偵測一取自於該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準；以及

令該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準與一標準值相比較，

其中若該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準高於該標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

本發明亦提供一種用於監測一人類個體體內的冠狀動脈疾病的方法，其包含有：

偵測一定期地取自於該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準；以及

令該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準與一標準值相比較，

其中若該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準高於該標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

依據本發明，該尿液樣品可以在任何時間下取自於該人類個體。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)。

依據本發明，該尿液樣品中的 sCD14 位準可以藉由本技藝中的通常技術者所熟知的任何用來定量 sCD14 的方法 (means) 而被偵測到。較佳地，該尿液樣品中的 sCD14 位準可以藉由一選自於下列所構成的群組中的免疫分析法

(immunoassay) 而被偵測到：多重免疫分析法 (multiplex immunoassay)、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)、螢光免疫分析法 (fluorescent immunoassay, FIA)、化學發光免疫分析法 (chemiluminescent immunoassay) 以及免疫濁度測定法 (immunonephelometry)。

依據本發明，定量 sCD14 是使用一種會專一性地結合 sCD14 之以抗體為基礎的結合部分 (antibody-based binding moiety) 而被進行。

在本發明的一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分是一抗體。在本發明的另一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分被標記以一選自於由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)、一化學發光標記 (chemiluminescent label)、一酵素標記 (enzymatic label) 以及一抗原決定位標籤 (epitope tag)。

如此處所用的，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 sCD14 專一性地結合 (免疫反應) 的抗原-結合位址 (antigen-binding site) 的分子]，並

且意欲涵蓋具有任一種同型(isotype)(例如，IgG、IgA、IgM、IgE 等等)的所有抗體以及包含它們的亦會與 sCD14 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[不論是單株的抗體、多株的抗體，或是該抗體的一免疫反應片段(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存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(binds)、被結合以(is bound by)，或與該待測物形成一複合物]。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：半抗原標記[例如，生物素/鏈黴抗生素蛋白(biotin/streptavidin)以及地高辛(digoxigenin, Dig)]、核酸[例如，寡核苷酸(oligonucleotide)]標記、化學發光標記、螢光

標記、酵素標記、放射性標記、抗原決定位標籤(例如，T7、c-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5 以及 HIS)，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)，它能夠與一特定蛋白質選擇性地反應。該等蛋白質水解的片段和/或重組型片段的非限制性實例包括 Fab、F(ab')<sup>2</sup>、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-結合決定位址的嵌合分子(chimeric molecules)。

在本發明的一個較佳具體例中，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，“經標記的抗體(labeled antibody)”包含藉由本技藝中的通常技術者所熟知的標準技術而被附接或結合至一個可偵測的標記(detectable label)的抗體，包括，但不限於：酵素地、放射性地

(radioactively)、螢光地 (fluorescently) 以及化學發光地 (chemiluminescently) 標記的抗體。

依據本發明的方法，當使用以抗體為基礎的結合部分來偵測 sCD14 時，在一尿液樣品中的 sCD14 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。

在本發明的一個較佳具體例中，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時會以一種可以據此而產生一個化學部分(chemical moiety)的方式來與該基質反應，該化學部分可藉由，例如分光光度計的方式 (spectrophotometric mean)、螢光標定的方式 (fluorometric mean) 或藉由視覺的方式 (visual mean) 而被偵測到。適用於本發明之可偵測的酵素包括，但不限於：蘋果酸去氫酶 (malate dehydrogenase)、葡萄球菌核酸酶 (staphylococcal nuclease)、 $\delta$ -V-類固醇異構酶 (delta-V-steroid isomerase)、酵母乙醇去氫酶 (yeast alcohol dehydrogenase)、 $\alpha$ -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)、 $\beta$ -半乳糖酶 ( $\beta$ -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)。

在本發明的另一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分是藉由將抗體結合至一螢光化合物(fluorescent compound)而被可偵測地標記。當被螢光地標記的抗體被曝露至具有適當波長的光時，它的存在可因螢光之故而被偵測到。適用於本發明之可偵測的螢光化合物包括，但不限於：CYE 染料(CYE dyes)、螢光素異硫氰酸鹽(fluorescein isothiocyanate, FITC)、玫瑰紅(rhodamine)、藻紅素(phycoerythrin)、柯里膦-O(coriphosphine-O, CPO)、藻藍蛋白(phycocyanin, PE)、別藻藍蛋白(allophycocyanin, APC)、鄰苯二甲醛(o-phthaldehyde)、螢胺(fluorescamine)以及串聯染料(tandem dyes)[諸如 PE-Cy5 (PC5)、PE-Cy7 (PC7)以及 PE-德州紅(PE-Texas Red)]。

依據本發明，該以抗體為基礎的結合部分亦可藉由將抗體附接至螢光放射金屬(fluorescence emitting metals)[諸如<sup>152</sup>Eu 或其他的鑭系元素(lanthanide series)]而被可偵測地標記。這些金屬可使用金屬-螯合基團(metal-chelating groups)[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。

在本發明的另一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分是藉由將抗體偶合至一化學發光化合物(chemiluminescent compound)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中所出現

的發光之存在而被測定。適用於本發明之可偵測的化學發光化合物包括，但不限於：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)。

在本發明的又另一個較佳具體例中，該以抗體為基礎的結合部分是藉由將抗體標記以一放射性同位素(radioactive isotope)而被可偵測地標記。該放射性同位素可以藉由使用一伽瑪計數器(gamma counter)、一閃爍計數器(scintillation counter)或藉由自動放射顯影術(autoradiography)之方式而被偵測到。適用於本發明的放射性同位素包括，但不限於： $^3\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$  以及  $^{125}\text{I}$ 。

依據本發明，術語“標準值(standard value)”可表示有關於健康個體之尿液中的 sCD14 位準的一正常範圍、一正常數值或一正常截斷值(cutoff value)(例如藉由一選定的方法所測得者)。在正常個體以及帶有冠狀動脈疾病的病患之間的一個適當的 sCD14 位準的截斷值可以藉由本技藝中的通常技術者所熟知的標準技術而被容易地測定到。

如本文中所用的，術語“健康個體”與“正常個體”可被互換地使用，並且意指一不帶有與冠狀動脈疾病有關聯的症狀或者不處於發展出冠狀動脈疾病的風險中的個體，亦即當該個體經由一醫學專家來進行檢查時，將會被診斷為是健康的。較佳地，該正常個體具有正常的冠狀動脈，並且不具有主動感染疾病(active infectious disease)、先前中風

(prior stroke)、急性冠狀症候群(acute coronary syndrome)以及惡性疾病(malignancies)的病史。

依據本發明，除了正常個體的尿液中的 sCD14 位準之外，為了評估冠狀動脈疾病之病理病況(pathological condition)的進展(progression)或一種針對冠狀動脈疾病之療法(treatment)的效用，一人類個體在一先前的檢查中所偵測到的尿液中的 sCD14 位準亦可被使用作為該人類個體的標準值。在此情況下，該人類個體在一之後的檢查(例如在經歷一為數個月的時間間隔之後所做的追蹤檢查)中所偵測到的 sCD14 位準可與該先前的檢查中所偵測到者相比較。

在本發明的一個較佳具體例中，該標準值是藉由使用人類 sCD14 酶素連結免疫吸附分析套組(human sCD14 enzyme linked immunosorbent assay kit)(Cat. No. HK320, HyCult Biotechnology, Uden, the Netherlands)的酶素結合免疫吸附分析法來進行測量，由此可得到一為  $3.51 \mu\text{g/mL}$  的數值並且被使用作為 sCD14 位準的截斷值。

### 【實施方式】

#### 較佳實施例之詳細說明

本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本發明的實施上的限制。

#### 實施例

##### 實驗個體：

參與本研究的實驗個體是藉由使用一由高雄市立聯合

醫院的醫學倫理委員會(The medical ethics committee of Kaohsiung Municipal United Hospital)所認可的操作程序而被募集，排除標準(exclusion criteria)包括具有主動感染疾病、先前中風、急性冠狀症候群以及惡性疾病的病史。此外，本發明中所研究的人類個體都有就他們的血清樣品以及尿液樣品之捐贈而取得經告知的同意(informed consent)。

本研究共計有 108 位人類個體參加，其中包括 73 位來自於心臟血管內科(cardiovascular internal medicine)並且經由血管攝影術(angiography)而被診斷為帶有冠狀動脈疾病(coronary artery disease, CAD)的個體(下稱 CAD 組)，以及 35 位具有正常的冠狀動脈的個體(下稱正常對照組)。有關這些個體的臨床資訊(clinical information)[諸如，性別、年齡、SYNTAX 計分值(SYNTAX score)以及病變血管的數目(number of diseased vessel)]被顯示於下面的表 1 中，其中 SYNTAX 計分值是參照 Sianos G. et al. (2005), *Eurorntervention*, 1:219-227 以及 <http://www.syntaxscore.com/> 當中所述的方式來進行評估，若所測得的 SYNTAX 計分值越高，表示 CAD 的複雜性(complexity)與嚴重性(severity)越高。

表 1. 在本發明中被研究的 35 位正常個體以及 73 位帶有 CAD 的病患的臨床資訊

	正常對照組	CAD 組
個體的數目	35	73
年齡 <sup>a</sup> (範圍)	$61.1 \pm 13.4$ (41~72 歲)	$66.5 \pm 11.7$ (46~82 歲)
性別(女性/男性)	14/21	31/42
SYNTAX 計分值 <sup>a</sup>	0	$28 \pm 14$
病變血管 的數目	單條血管疾病(one-vessel disease)(個體的數目)	NA <sup>b</sup>
	多條血管疾病(multi-vessel disease <sup>c</sup> )(個體的數目)	NA
		20
		53

<sup>a</sup>：平均值土標準偏差 (standard deviation, S.D.)

<sup>b</sup>：NA，不適用 (not applicable)

<sup>c</sup>：多條血管疾病代表具有 2 條或 3 條病變的血管 (diseased vessel)

### 一般實驗方法：

#### 1. 血清樣品的收集：

在經歷至少 8 小時的隔夜禁食 (overnight fasting) 之後，藉由使用針頭而從各個實驗個體的橈動脈 (radial artery) 來收集血液，繼而在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 3,000 rpm 予以離心歷時 10 分鐘，藉此而得到血清樣品。

#### 2. 尿液樣品的收集：

收集各個實驗個體的第一次中段早晨尿液 (first midstream morning urine)，並且以 1,000 g 予以離心歷時 5 分鐘，所得到的上澄液被使用作為尿液樣品。

#### 3. 統計學分析 (Statistical analysis)：

在下面的實施例中，各組實驗數據被重複 3 次，而實驗數據是以平均值(means)±標準偏差(standard deviation, S.D.)來表示。所有的數據是藉由變異數分析(ANOVA)，繼之以卡方檢定(Chi-square tests)來作分析，俾以評估各組之間的差異性。若所得到的統計分析結果是  $p < 0.05$ ，代表有統計學顯著性(statistical significance)。

### 實施例 1. 在正常個體以及帶有 CAD 的病患的尿液中的可溶性 CD14 (soluble CD14, sCD14)表現量的分析

為了瞭解尿液中的 sCD14 的表現量與 CAD 的嚴重程度的關聯性，在本實施例中，正常個體以及具有不同 SYNTAX 計分值的病患的尿液被拿來進行比較。

#### 實驗方法：

##### A、製備來自於尿液的蛋白質樣品：

申請人從正常對照組以及 CAD 組個體中分別選出 2 位正常個體(他們的 SYNTAX 計分值皆為 0)以及 6 位帶有不同的 CAD 複雜性與嚴重性(with different complexity and severity of coronary artery disease)的病患(他們的 SYNTAX 計分值分別為 2、2、4、12、25 以及 34)來進行下面的實驗。

首先，依照上面“一般實驗方法”的第 2 項「尿液樣品的收集」當中所述的方法來收集這 8 位個體的尿液樣品，接著對所得到的尿液樣品各取 7 mL 並分別加入 7 mL 的 10% 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)溶液[含有 6 mM 二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)]，然後置於冰上進行反應歷時 30

分鐘，藉此而使得蛋白質沉澱物(protein pellets)被析出。之後，於 4°C 下以 13,000 rpm 來進行離心歷時 30 分鐘，繼而收集該蛋白質沉澱物並以冰冷的 100%丙酮(acetone)(含有 6 mM DTT)予以洗滌 2 次，然後以 13,000 rpm 來進行離心。將所得到的蛋白質沉澱物散浮(suspended)於 0.3 mL 的復水緩衝液(rehydration buffer)[含有 9.8 M 尿素、0.5% Triton X-100、65 mM DTT 以及 0.5%兩性電解質(ampholytes)]中，藉此而得到蛋白質樣品。

● 所得到的蛋白質樣品是使用 2-D 定量套組(2-D Quant Kit)(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)來進行蛋白質濃度的定量，繼而將之拿來進行下面第 B 項的分析。

#### B、聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析以及西方墨點(Western blotting)分析：

● 取 10 µg 在上面第 A 項中所製得的蛋白質樣品，並予以加入 5 倍體積的樣品裝填緩衝液(sample loading buffer)[含有 10% SDS、0.3125 M Tris-HCl (pH 6.8)、10%甘油、0.5 M DTT 以及 0.01%溴酚藍(bromphenol blue)]，繼而置於 95 °C 下進行變性反應歷時 5 分鐘。

接著，使用垂直電泳槽(Hoefer SE260, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)來進行 SDS-PAGE 分析。首先，製備一聚丙烯醯胺凝膠片，它分為 2 層，分別是 12.5% 的 SDS-PAGE 分離凝膠(SDS-PAGE separating gel)與 5% 的 SDS-PAGE 聚積凝膠(SDS-PAGE stacking gel)。之後，

將所得到的經變性的蛋白質樣品裝填(loading)至該凝膠片的樣品槽(sample well)內並於 8°C 下以 80 V 的電壓來進行電泳歷時 30 分鐘，繼而於 120 V 的電壓下來進行電泳，當追蹤染劑(tracking dye)到達距離該凝膠片底部約 0.1~0.2 公分處時，終止電泳。

在電泳結束之後，使用轉漬電泳槽(TE 22 Mini Tank Transfer Unit, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)，並以一為 40 mA 的固定電流將該凝膠片上被分離的蛋白質轉印至聚二氟乙烯(PVDF)膜 [polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) membrane](Millipore, Bed-ford, MA, USA)上歷時 12 小時。接著，將轉印後的 PVDF 膜取出並於室溫下以 5% 脫脂乳 (skimmed milk)[配於 Tris 緩衝生理鹽水/Tween-20 (Tris-buffered saline/Tween-20, TBS-T) 中]進行封阻(blocking)處理歷時 1 小時，繼而以 TBS-T 予以洗滌 3 次，每次 10 分鐘。之後，加入兔子抗-CD14 多株抗體(rabbit anti-CD14 polyclonal antibody)(Cat. No. GTX101342, Genetex, San Antonio, TX, USA)作為一次抗體(primary antibody)(以 TBS-T 予以稀釋 1000 倍)，並置於 4°C 下反應隔夜後，以 TBS-T 予以洗滌 3 次，每次 10 分鐘。接著，加入綴合有辣根過氧化酶的山羊抗-兔子 IgG 抗體(goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase)(Cat. No. L3032, Signalway Antibody, Pearland, TX, USA)作為二次抗體(secondary antibody)(以 TBS-T 予以稀釋 5000 倍)，並置於室溫下反應歷時 1 小時後，以 TBS-T

予以洗滌 3 次，每次 10 分鐘。

接著，以一增強化學發光受質 (enhanced chemiluminescence substrate)(Pierce, Rockford, IL, USA)來處理 PVDF 膜，繼而使用一 ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS<sup>+</sup> 系統 (ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS<sup>+</sup> System)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)來進行拍照。所得到的照片是使用掃描光學密度軟體 (scanning densitometry software)(Multi Gauge V3.0)來進行光學密度分析 (densitometric analysis)，藉此各個實驗個體的尿液中的 sCD14 的訊號強度 (signal intensity) 能夠從該等照片的色帶中被定量地計算出一相對應的數值。另外，該等照片的非色帶之處被使用作為背景 (background) 並進行相同的光學密度分析。

之後，將所得到的 sCD14 訊號強度的定量數值代入下面的公式(1)來計算出各個實驗個體的尿液中的 sCD14 表現量 (%)：

$$\text{公式 (1)} : A = (B - C/C) \times 100$$

其中：A=sCD14 表現量 (%)

B=sCD14 訊號強度的定量數值

C=背景訊號強度的定量數值

**結果：**

圖 1 顯示在正常對照組個體與 CAD 組病患的尿液中的 sCD14 表現量。從圖 1 可見，與正常對照組的個體相較之下，具有不同的 SYNTAX 計分值的病患的 sCD14 表現量皆有顯著的增加，並且會隨著 SYNTAX 計分值的增加而更趨

於明顯[趨勢  $P$  值 ( $p$  for trend) $<0.001$ ]。這個實驗結果顯示：尿液中的 sCD14 的位準與 CAD 的嚴重程度具有顯著的正相關性(positive correlation)，因而可作為一種用於偵測 CAD 的潛在生物標記。

### 實施例 2. 在正常個體以及帶有 CAD 的病患的尿液與血清中的可溶性 CD14 (sCD14)表現量的分析

在本實施例中，正常個體以及帶有不同的病變血管數目的病患的血清以及尿液被拿來進行 sCD14 的酵素連結免疫吸附分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)，俾以評估血清與尿液中的 sCD14 的表現量與 CAD 的病症程度的關聯性。

#### 實驗方法：

首先，依照上面“一般實驗方法”的第 1 項「血清樣品的收集」當中所述的方法來收集 73 位帶有 CAD 的病患(他們分別帶有單條或多條血管疾病)以及 35 位正常對照組個體的血清樣品。另外，依照上面“一般實驗方法”的第 2 項「尿液樣品的收集」當中所述的方法來收集這些個體的尿液樣品。

之後，使用人類 sCD14 酵素連結免疫吸附分析套組(human sCD14 enzyme linked immunosorbent assay kit)(Cat. No. HK320, HyCult Biotechnology, Uden, the Netherlands)並依據製造商的操作指南來量測所得到的血清樣品以及尿液樣品中的 sCD14 濃度。

此外，使用 SPSS 16.00 軟體(SPSS, Chicago, IL)來分析

各個實驗個體的尿液樣品中所測得的 sCD14 濃度，藉此而得到一受試者操作特徵(ROC)曲線。而有關於尿液 sCD14 (urinary sCD14)在該 ROC 曲線之下的區域[亦即 ROC 曲線下面積(area under the ROC curve, AUC)]被計算出來，並且被使用作為一種用於評估尿液 sCD14 是否具有一良好的診斷力而可以區別 CAD 組與正常對照組的指數(index)。

#### 結果：

下面表 2 顯示正常對照組個體以及 CAD 組病患的血清以及尿液中的 sCD14 濃度。從表 2 可見，就血清中的 sCD14 濃度而言，正常對照組與 CAD 組之間並無顯著的差異。相反地，就尿液中的 sCD14 濃度而言，與正常對照組個體相較之下，帶有單條血管疾病或多條血管疾病的病患的 sCD14 位準皆顯著地被增高，而帶有多條血管疾病的病患的 sCD14 位準相較於帶有單條血管疾病的 CAD 病患所具者亦呈現出增高的情形。

表 2. 各組實驗個體的血清以及尿液中的 sCD14 濃度

組別	正常對照組	CAD 組	
	(n=35)	帶有單條血管疾病的病患(n=20)	帶有多條血管疾病的病患(n=53)
血清中的 sCD14 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$132.81 \pm 37.51$	$122.32 \pm 39.67$	$132.92 \pm 36.74$
尿液中的 sCD14 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$2.08 \pm 2.02$	$9.55 \pm 12.36^*$	$11.1 \pm 10.92^{**\#}$

\*：當帶有單條血管疾病的病患與正常對照組個體相比較， $p < 0.001$

\*\*：當帶有多條血管疾病的病患與正常對照組個體相比較， $p < 0.001$

#：當帶有多條血管疾病的病患與帶有單條血管疾病的病患相比較， $p = 0.605$

另外，經由受試者操作特徵(ROC)曲線分析可發現，ROC 曲線下面積(AUC)為 0.846，而有關於尿液的 sCD14 位準的截斷值(cutoff value)是  $3.51 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，這表示當一人類個體的尿液中的 sCD14 位準  $\geq 3.51 \mu\text{g}/\text{mL}$  時，該人類個體可能帶有冠狀動脈疾病(CAD)。依據該 sCD14 位準的截斷值，CAD 診斷的靈敏度以及專一性可分別地達至 84% 以及 70%。

綜合以上的實驗結果可知：相較於血清中的 sCD14，尿液中的 sCD14 更適合作為一種用於偵測 CAD 的生物標記，並且對於 CAD 的診斷具有更好的專一性以及靈敏度。因此，申請人認為：尿液中的 sCD14 具有成為一診斷標記(diagnostic marker)的潛力，因而可供應用於快速地偵測或初步篩選一人類個體體內的冠狀動脈疾病。

於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

#### 【圖式簡單說明】

圖 1 顯示在正常對照組個體與 CAD 組病患的尿液中的 sCD14 表現量。

#### 【主要元件符號說明】

(無)

## 七、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冠狀動脈疾病的 方法，其包含有：

    偵測一取自於該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準；以及

    令該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準與一標準值相比較，

其中若該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準高於該標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。

2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該 sCD14 位準是藉由使用下列方法學之任一者來定量 sCD14 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、免疫放射量測定分析法、螢光免疫分析法、化學發光免疫分析法以及免疫濁度測定法。
3. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中定量 sCD14 是使用一會專一性地結合 sCD14 之以抗體為基礎的結合部分而被進行。
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，其中該可偵測的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、一化學發光標記、一酵素標記以及一

抗原決定位標籤。

7. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中偵測該尿液樣品中的 sCD14 位準是藉由酵素結合免疫吸附分析法而被進行，並且該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準的截斷值被測定為  $3.51 \mu\text{g/mL}$ 。
8. 一種用於監測一人人類個體體內的冠狀動脈疾病的方法，其包含有：
  - 偵測一定期地取自於該人類個體的尿液樣品中的 sCD14 位準；以及
  - 令該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準與一標準值相比較，
  - 其中若該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準高於該標準值，該人類個體被認定為具有冠狀動脈疾病。
9. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中該 sCD14 位準是藉由使用下列方法學之任一者來定量 sCD14 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、免疫放射量測定分析法、螢光免疫分析法、化學發光免疫分析法以及免疫濁度測定法。
10. 如申請專利範圍第 9 項的方法，其中定量 sCD14 是使用一會專一性地結合 sCD14 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，其中該可偵測的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、一化學發光標記、一酵素標記以及一抗原決定位標籤。
14. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中偵測該尿液樣品中的 sCD14 位準是藉由酵素結合免疫吸附分析法而被進行，並且該尿液樣品中所偵測到的 sCD14 位準的截斷值被測定為  $3.51 \mu\text{g/mL}$ 。

## 八、圖式：

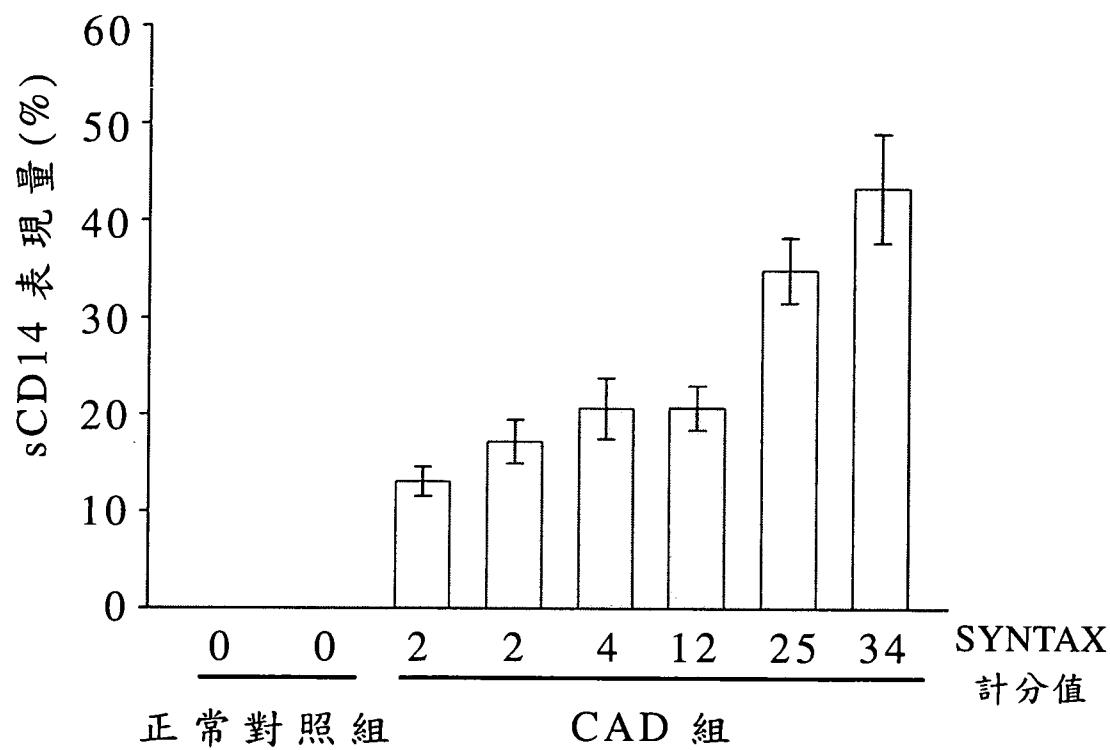


圖 1