



(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 I856560 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：112109527

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 15 日

(51)Int. Cl. : G01N33/543 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2015/07/15 美國

62/192,962

(71)申請人：美商蓋斯特維炫股份有限公司 (美國) GESTVISION, INC. (US)

美國

(72)發明人：戴維斯 溫蒂 DAVIS, WENDY (US) ; 李文森 丹尼 LEVENSON, DANNY (US)

(74)代理人：楊長峯

(56)參考文獻：

TW 200801190A

US 5804452

US 2011/0280863A1

審查人員：蔡宗澤

申請專利範圍項數：67 項 圖式數：5 共 63 頁

(54)名稱

用於檢測折疊錯誤蛋白質之裝置及其使用方法

(57)摘要

本發明係關於一種診斷裝置及使用該裝置檢測目的蛋白之方法，該目的蛋白與哺乳動物的疾病或功能失調相關。具體上，目的蛋白可為與哺乳動物之部分蛋白質折疊錯誤疾病相關之折疊錯誤蛋白質，該哺乳動物包含疑似罹有該疾病或處於該疾病風險之哺乳動物。

The present invention relates to diagnostic devices as well as methods of using these devices for detecting proteins of interest associated with diseases or disorders in mammals. In particular, the proteins of interest may be misfolded proteins associated with certain misfolded-protein disorders in mammals including those mammals suspected of or at risk of having such disorders.



I856560

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於檢測折疊錯誤蛋白質之裝置及其使用方法

【英文發明名稱】 DEVICE FOR DETECTING MISFOLDED PROTEINS AND
METHODS OF USE THEREOF

【中文】

本發明係關於一種診斷裝置及使用該裝置檢測目的蛋白之方法，該目的蛋白與哺乳動物的疾病或功能失調相關。具體上，目的蛋白可為與哺乳動物之部分蛋白質折疊錯誤疾病相關之折疊錯誤蛋白質，該哺乳動物包含疑似罹有該疾病或處於該疾病風險之哺乳動物。

【英文】

The present invention relates to diagnostic devices as well as methods of using these devices for detecting proteins of interest associated with diseases or disorders in mammals. In particular, the proteins of interest may be misfolded proteins associated with certain misfolded-protein disorders in mammals including those mammals suspected of or at risk of having such disorders.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於檢測折疊錯誤蛋白質之裝置及其使用方法

【英文發明名稱】 DEVICE FOR DETECTING MISFOLDED PROTEINS AND
METHODS OF USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種用於檢測蛋白質之裝置及方法，更具體而言，係關於一種用於檢測哺乳動物動物的折疊錯誤蛋白質之裝置及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 根據美國婦產科醫生學會(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)，包含子癇前症(preeclampsia)併發的妊娠高血壓疾病涵蓋了全球約 10 %的孕婦且為母體與胎兒罹病及死亡之主因[參考資料：懷孕中高血壓，美國婦產科醫生學會專案組於懷孕中高血壓的報告，婦產科 122，122 卷，第 5 號，2013 年 11 月(ACOG 2013 準則)(Hypertension in Pregnancy, Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy, Obstetrics and Gynecology 122 VOL. 122, NO. 5, NOVEMBER 2013 (the ACOG 2013 guidelines))]。此外，以上症狀為早產及相關併發產期死亡之主因[參考文獻： Ananth CV, Vintzileos AM. J Matern Fetal Neonatal Med. 2006;19(12):773-82]。妊娠高血壓可被分類成 1) 子癇前症 - 子癇症(preeclampsia-eclampsia)、2) 慢性高血壓、3) 慢性高血壓併發子癇前症(chronic

hypertension with superimposed preeclampsia) 或 4) 妊娠高血壓 (gestational hypertension)。

【0003】 子癇前症-子癇症為一種已知甚少之懷孕相關症狀，其為母體死亡、早產、以及用於生育的健保花費提升之主因。在全球，有 76,000 位準母親死於子癇前症。子癇前症在美國是與懷孕相關死亡的五分之一的的原因，且其症狀可導致痙攣、器官衰竭及死亡。該病症大多發生於懷孕約 20 週之後，且婦女直到產後期仍有風險。該病症可導致稱為子癇症的痙攣或抽搐。子癇前症可被分類為輕度、重度、較不嚴重、更重度或無重度特徵的子癇前症、或有重度特徵的子癇前症。子癇前症亞型的溶血性肝臟酵素升高低血小板 (hemodialysis-elevated liver enzyme-low platelet count, HELLP)症候群的特徵為病人罹有溶血症狀、肝臟酵素升高及低血小板量的症狀。病人具有不正常併發症狀之子癇前症稱為非典型子癇前症 (atypical preeclampsia)

【0004】 其唯一已知的治療方式為分娩嬰兒，因此子癇前症為醫學上指示的早產之主因，估計為所有早產的 17 %。美國健保系統對於子癇前症的母親及嬰兒之分娩及照護的花費估計超過 130 億美金。現今，子癇前症在診斷上仍為挑戰，因其只能藉由其症狀來確認：通常為高血壓及尿蛋白的存在。對於改善子癇前症診斷的研究通常為尋找被調升或調降之血液中已知生物標記，但幾乎沒有發現已量產的全球性有效的診斷產品。

【0005】 利用需要因子癇前症診斷的醫學上指示分娩 (medically indicated delivery due to a diagnosis of preeclampsia, MIDPE) 之重度子癇前症的婦女尿液樣本及無偏差質譜蛋白質圖譜法 (unbiased mass spectrometry protein profiling

approach)進行研究並找出 SERPINA-1 及白蛋白(albumin)的唯一非隨機裂解產物。傾向 SERPINA-1 斷片(fragment)折疊錯誤並形成超分子聚集體(supramolecular aggregates)的資訊而提出子癩前症可能為折疊錯誤疾病，而與阿茲海默症(Alzheimer's disease)不同[參照美國專利第 8,263,342 號及 Buhimsch 等人，*Am J Obstet Gynecol.* 2008 November; 199(5): 551.e1–551.16. doi:10.1016/j.ajog.2008.07.006.]。此外，基於蛋白質與剛果紅(Congo Red，CR)染劑(嗜剛果紅蛋白質，congophilla)結合之折疊錯誤蛋白質從患有子癩前症之婦女尿液內發現。與構形狀態相依抗類澱粉聚集體抗體(conformational state-dependent anti-amyloid aggregate antibodies)結合的一或多個的摺疊錯誤蛋白質或「超分子聚集體」與高度活化類澱粉前驅蛋白[amyloid precursor protein，APP]作用途徑相關且類澱粉樣蛋白沉積在子癩前症婦女的胎盤(參照 Buhimschi 等人，*Sci. Transl. Med.* 6，245ra92 (2014)]。在清洗之後，親和性點漬法(dot blot affinity assay)測量 CR 留存之比例(因與折疊錯誤蛋白質結合)(如原 CR 之%)且結果以剛果紅留存(Congo Red Retention，CRR) %呈現。

【0006】 在 80 位婦女(其中 40 位需要醫學上指示的分娩及 40 位為「控制組」的健康孕婦)之可行性研究中，剛果紅留存%在重度子癩前症之尿液中顯著較高($P < 0.001$)，該結果具 100% 靈敏度及特異性。在 582 位婦女(為橫向及縱向世代)的效度研究中，其中患有重度子癩前症及子癩前症合併存在高血壓或蛋白尿症(proteinuria)的婦女具有比其他所有臨床分類高的剛果紅留存% ($P < 0.001$)。此外，75% 診斷患有輕度子癩前症、89% 診斷患有重度子癩前症及 91% 診斷患有合併子癩前症之婦女具有高於其他組別之剛果紅留存結果($P < 0.05$)。整體而言，在子癩前症需要 MIDPE 的預測中，在效度世代中僅剛果紅留存具有

85.9% 靈敏度及 85.00% 特異性，95% 的陽性概度比(positive likelihood ratio)與 95% 的陰性概度比(negative likelihood ratio)。剛果紅留存優於目前用於子癩前症的臨床上篩選方法(相較於血壓或尿蛋白量測桿 $P < 0.001$ ；相較於美國婦產科醫生學會(ACOG)建議臨界值之合併血壓與尿蛋白的結合 $P = 0.004$) (Buhimschi 等人，*Sci. Transl. Med.* 6, 245ra92 (2014) 及 美國專利第 9,229,009 號)。

【0007】 剛果紅亦與纖維素結合，其用以建立基於分析的簡單試紙。將應用於試紙上以產生染劑與試紙內的纖維素結合之一般的尿液-染劑混合物顯現成紅色緊實中心點。反之，具有嗜剛果紅尿蛋白之婦女尿液由於染劑已與該蛋白結合而不再與纖維素結合，因此替代地以擴散形式分散而顯示成暈圈(hole)(參照美國專利申請公報第 20150293115 號)。在參照生產及分娩篩檢中心進行排除子癩前症之 346 位婦女的臨床實驗中，病患尿液利用 CR 簡易試紙分析(CRD)進行測試。CRD 測試根據 ACOG 2013 準則定義對子癩前症的診斷證實有 79% 靈敏度、89% 特異性、91% 的陰性預測值、74% 的陽性預測值[參考文獻：Rood 等人 2016 AJOG，214 卷，第 1 期，附錄，S24-S25 頁(Rood et al 2016 AJOG Volume 214, Issue 1, Supplement, Pages S24–S25)]。CRD 測試在將尿液運用於試紙前，需要混合尿液及染劑之步驟，且其結果可能在讀取及解釋上具有挑戰。

【0008】 如上所述，可使用在照護點以檢測懷孕哺乳動物且特指婦女之子癩前症可能性之簡易診斷裝置仍具有高度意義及未滿足的需求性。該裝置藉由提供關於婦女是否具有罹患子癩前症之風險或已罹患子癩前症之早期資訊，並藉此因接收立即的治療性介入，因而可具有拯救成千上萬位懷孕婦女及其未出生之嬰兒之潛力。

【0009】 本文所提及的所有專利及出版物其全部內容於此併入作為參考。

【發明內容】

【0010】 本發明包括用於檢測哺乳動物之生物樣本內至少一蛋白質之診斷裝置。該裝置包含 a) 樣本接收材料，其中樣本接收材料可接收生物樣本； b) 檢測試劑，其中該檢測試劑可與存在於生物樣本中之至少一蛋白質反應(即結合)； c) 分離器(trap)，其中分離器與樣本接收材料接觸且可與生物樣本中至少一蛋白質結合之檢測試劑與沒有與生物樣本中至少一蛋白質結合之檢測試劑分離，因而與生物樣本中至少一蛋白質結合之檢測試劑可流經分離器，且因而未與生物樣本中至少一蛋白質結合之檢測試劑藉由分離器捕捉； d) 毛細管床，其中毛細管床與分離器接觸，且其中該毛細管床配置成含有在生物樣本流經分離器後含有生物樣本。若在生物樣本檢測到至少一蛋白質時，該毛細管床顯示結合的檢測試劑。樣本接收材料、分離器以及該毛細管床配置成依序接觸。該裝置之樣本接收材料可包含例如檢測試劑。並且，檢測試劑可位於樣本接收材料之上或其之內。

【0011】 再者，該裝置可裝入(encased)於外殼或片匣。外殼或片匣可包含用於施用生物樣本之槽(或其他入口)且亦可包含用於讀取所獲取的結果之窗口。該裝置可使用在各種臨床或非臨床環境或於臨床實驗室之照護點。

【0012】 如前述，檢測試劑與生物樣本中至少一蛋白質結合。該至少一蛋白質可例如為：折疊錯誤蛋白質、蛋白質聚集體(aggregated protein)、超分子蛋白質聚集體(supramolecular aggregated protein)及其混合物及各蛋白質之斷片。該至少一蛋白質可包含 β -褶板結構(beta sheet structure)。此外，該至少一蛋白質可為嗜剛果紅性(congophilic)。折疊錯誤蛋白質可包

含，例如： α 1-抗胰蛋白酶(alpha-1 antitrypsin)(SerpA1)、血漿銅藍蛋白(ceruloplasmin)、重鏈 IgG、輕鏈 IgG、可誘導干擾素蛋白質 6-16(interferon-inducible protein)(IF-16-6，G1P3)、白蛋白(albumin)，以及其混合物及其斷片、或各蛋白的斷片。然而，折疊錯誤蛋白質不限於此些蛋白質。例如，折疊錯誤蛋白質可為任何蛋白質(或蛋白質組合)，其導致折疊錯誤疾病或與其相關。

【0013】 本檢測試劑可為例如：偶氮染劑(azo dye)、硫代黃素 T (Thioflavin T)以及偶氮染劑之相似物。可與本發明結合使用之偶氮染劑之一例為剛果紅(即，二鈉 4-氨基-3-[4-[4-(1-氨基-4-磺酸根基-萘-2-基)二氮烯基苯基]苯基]二氮烯基 - 萘 -1- 磺酸 (disodium 4-amino-3-[4-[4(1-amino-4-sulfonato-naphthalen-2-yl)diazenylphenyl]phenyl]diazenyl-naphthalene-1-sulfonate)) (亦可使用剛果紅之類似物，例如：化學式 $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ 之二級重氮染劑(secondary diazo dye)使用作為與本發明之裝置結合使用之檢測試劑)。剛果紅可預載入至前述之樣本接收材料上。

【0014】 本發明所述之裝置之該樣本接收材料可包含例如：硝化纖維素(nitrocellulose)、纖維素(cellulose)、玻璃纖維、棉花、編織篩網、不織布材料、多孔性塑膠、聚合物及/或聚酯類(polyester)。該聚酯類可為例如：聚乙烯(polyethylene)。

【0015】 本發明所述之裝置之分離器可包含例如：硝化纖維素、纖維素、玻璃纖維、棉花/玻璃纖維、編織篩網、不織布材料、聚合物及/或聚砜類(polysulfone)。

【0016】 本發明之裝置之毛細管床可包含例如：硝化纖維、層析紙、聚矽類及/或纖維素等。

【0017】 尤其值得提及的是，本發明之裝置可在約 10 分鐘或 10 分鐘內以下，較佳為約 5 分鐘或 5 分鐘內，更佳為約 3 分鐘或 3 分鐘內，且最佳為約 1 分鐘或 1 分鐘內提供測試結果。再者，其一可藉由可視化提供定性或半定量。此外，如有需要，其一亦可獲得半定量結果或定量結果，以測量至少一蛋白質之量。

【0018】 本發明亦包括前述之診斷裝置，其用於檢測生物樣本中之折疊錯誤蛋白質，用於檢測生物樣本內之蛋白質聚集體及/或用於檢測生物樣本內之超分子蛋白質聚集體，其中該樣本自哺乳動物取得，例如：人類、靈長類以及基因工程哺乳動物。在部分範例中，該哺乳動物可為懷孕個體。如前述之裝置可用於檢測子癰前症，當檢測試劑與生物樣本所含之折疊錯誤蛋白質、蛋白質聚集體及/或超分子蛋白質聚集體(即與懷孕哺乳動物之子癰前症相關之蛋白質)反應(即結合)時，則可診斷為子癰前症。裝置之分離器可配置成與裝置之檢測試劑進行競爭性(competitively)結合。該裝置可配置側流裝置(lateral flow device)或包含樣本接收材料、分離器及毛細管床之測試片。

【0019】 此外，本發明包含檢測哺乳動物之生物樣本中之至少一蛋白質之方法，該方法包含以下步驟：a) 在足以允許至少一蛋白質與檢測試劑結合的情況下，將哺乳動物的生物樣本施加至本發明之診斷裝置的樣本接收材料一段時間；及 b) 檢測於毛細管床上之檢測試劑的存在，其中毛細管床上之檢測試劑的存在表示至少一蛋白質存在於生物樣本。

【0020】該方法可用於檢測患有蛋白質折疊錯誤疾病 (misfolded-protein disorders)或處於患有蛋白質折疊錯誤疾病風險之哺乳動物之生物樣本內至少一蛋白質。該方法包含以下步驟：(a)在足以允許至少一蛋白質與檢測試劑結合的時間及條件下，將哺乳動物的生物樣本施加至上述診斷裝置的樣本接收材料一段時間及 (b) 檢測於毛細管床上結合之檢測試劑的存在，其中毛細管床上之檢測試劑的存在表示至少一蛋白質存在於生物樣本，且代表該哺乳動物患有蛋白質折疊錯誤疾病。再者，該至少一蛋白質可為例如：折疊錯誤蛋白質、蛋白質聚集體、超分子蛋白質聚集體、或其混合物、或具有 β -褶板結構之蛋白質，例如嗜剛果紅蛋白質。該至少一蛋白質可為嗜剛果紅性及/或具有 β -褶板結構。更具體而言，折疊錯誤蛋白質可包含，例如： $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(SerpinA1)、血漿銅藍蛋白、重鏈 IgG、輕鏈 IgG、可誘導干擾素-蛋白質 6-16(IF-16-6，G1P3)、白蛋白、其混合物及其斷片或上述各蛋白質之斷片。蛋白質折疊錯誤疾病可為例如：子癇前症、阿茲海默症(Alzheimer's disease)、傳染性蛋白顆粒疾病(prion disease)以及帕金森氏症(Parkinson's disease)。在其他經確認為蛋白質折疊錯誤疾病之疾病或症狀中發現之折疊錯誤蛋白質亦可藉本發明之裝置檢測。關於使用本發明之裝置診斷子癇前症，其可診斷不同型態之子癇前症，其包括例如：輕度子癇前症(mild preeclampsia)、重度子癇前症(severe preeclampsia)、非典型子癇前症(atypical preeclampsia)、溶血性肝臟酵素升高低血小板 (hemodialysis-elevated liver enzyme-low platelet count，HELLP)症候群及子癇症(eclampsia)。此外，病患可患有妊娠高血壓疾病，因此，本方法可用於識別性診斷部分妊娠高血壓疾病，例如辨別

子癇前症與高血壓症狀，如慢性高血壓、妊娠高血壓、其他原因造成之高血壓，或辨別前述子癇前症之型態。

【0021】 前述方法使用且施加至樣本接收墊之生物樣本可為例如：尿液(乾淨或自然獲取)、血液、唾液、組織、組織液、血清、血漿、腦脊髓液、羊水以及萃取物質(例如：鼻腔分泌、耳垢、排泄物及組織之萃取物)。該方法可針對與哺乳動物相關之生物樣本使用，例如：人類、靈長類及基因工程哺乳動物。哺乳動物可為懷孕個體。在人類的情況下，該方法使用於約懷孕 8 至 42 週之孕婦(即，胎齡)，較佳為懷孕約 18 至 41 週，更佳為懷孕 20 至 41 週或 20 週以分娩。然而本發明之方法亦可使用於產後哺乳動物。尤其值得提及的是，使用該裝置、利用該方法所檢測之至少一蛋白質可藉由視覺化檢測以取得定性或半定量結果，或藉由測量檢測以取得半定量或定量結果。視覺化後，可測量至少一蛋白質以取得半定量或定量結果。

【0022】 此外，本發明包括包含前述裝置之套件。該套件亦可包含校準器或控制組試劑以及該裝置之使用說明書。並且，該套件亦可包含樣本施用器。

【圖式簡單說明】

【0023】 第 1 圖呈現位於片匣或外殼中的本發明之測試片(test strip)裝置之照片。第 1 圖的左側描繪在與生物樣本接觸之前外殼中的裝置，其具有樣本槽、結果窗口及控制線。第 1 圖的右側呈現該裝置測試已知與子癇前症相關之折疊錯誤蛋白質為陰性、弱陽性及陽性之尿液樣本的結果。

【0024】 第 2 圖呈現本發明裝置之測試片實施例之範例。該測試片包含控制組染劑、顯示片(或毛細管床)、分離器(例如，三片材料)、第二樣本墊(或樣本接收材料)、第一樣本墊(或樣本接收材料)及於樣本墊上乾燥之染劑。

【0025】 第 3 圖呈現本發明之診斷裝置之實施例。第 3 圖 A 部分呈現具有樣本墊、分離器、及顯示片之俯視圖。第 3 圖 B 部分呈現從側面觀看第 3 圖 A 部分之相同實施例。該樣本墊、分離器及顯示片可彼此對接(butted)。第 3 圖 C 部分呈現彼此重疊的樣本墊、分離器及顯示片之實施例(側面圖)。

【0026】 第 4 圖顯示於測試片內之不同材料配置。第 4 圖 A 部分呈現具有兩個樣本墊、分離器及顯示片(毛細管床)的本發明之替代實施例，其各片依序具有與相鄰片的重疊。第 4 圖 B 部分呈現具有依序重疊的兩個樣本墊、三重分離器及顯示片之本發明的另一替代實施例，其各片具有與相鄰片的重疊。

【0027】 第 5 圖呈現本發明的測試片的量桿配置之範例。此實施例於測試片之頂部上配置有覆蓋帶。在測試片之頂部，覆蓋帶為不透明顏色且可用於支持測試片。於中間部，覆蓋帶為透明以提供用於結果的觀測窗。覆蓋帶可被配置成使透明觀測窗於例如分離器之上的約 10 mm。於觀測窗的覆蓋帶可由顏色(例如，白色)所環繞，以易於觀測結果。於分離器之下，覆蓋帶為不透明顏色以覆蓋分離器。於測試片之底部，覆蓋帶可顯示以指示利用何端浸入測試樣本中的箭頭，且可顯示以指示測試片浸入樣本之最大程度的線。於測試片的尾端可沒有覆蓋帶，以便於浸入時測試樣本的吸附(wicking)。

【實施方式】

【0028】 本發明為裝置以及該裝置之使用方法。更具體而言，該裝置為可用於數種臨床及非臨床環境的快速測流層析測試(lateral flow chromatographic rapid test)，以檢測生物樣本中關注的蛋白質。該裝置可用於檢測哺乳動物的蛋白質折疊錯誤疾病。該哺乳動物可為懷疑患有一或多個此疾病或處於其風險中。

【0029】 本文將描述具有數種不同之實施例的裝置。基本上，其包含用於檢測生物樣本內之一或多個目的蛋白(protein of interest)之測試片(參照例如第 1 圖)。該檢測藉由一連串反應的手段執行。該測試片包含具有毛細作用的一段側流分析或層析材料，且具有層析溶劑運輸起始的第一端。其亦具有層析溶劑運輸終點的第二端。測試片包含位在第一端與第二端之間的複數個區域或區(參照例如第 2 圖及第 3 圖)。該區域包含由檢測試劑，例如染劑浸染之第一區域。該檢測試劑與該生物樣本內一或多個目的蛋白進行特異性結合。第一區域亦接收生物樣本。相較之下，為第一區域下游之第二區域留存未與生物樣本中一或多個目的蛋白結合之檢測試劑，並且與該生物樣本內之一或多個目的蛋白結合之檢測試劑將被轉移至第三區域。位於該第二區域之下游的測試片的第三區域接收通過第二區域後之樣本。若目的蛋白存在於樣本時，則第三區域將顯示檢測試劑。其亦包含用於檢測結合蛋白質的檢測試劑以作為測量生物樣本內一或多個蛋白質的手段。在一實施例中，該裝置確認了取自病患之生物樣本中的折疊錯誤蛋白質的存在，且可確定病患是否具有蛋白質折疊錯誤疾病。一或多個蛋白質的存在可經由視覺定義的定性或半定量，或可藉由使用可存在於裝置內之測量元件進行半定量或定量。在生物樣本施加於第一區域後，第一區域於樣本中釋出檢測試劑，且該第二區域分離與一或多個蛋白質結合之檢測試劑及未結合之檢測試劑，並僅容許結合之檢測試劑轉移至第三區域，且接著顯示用於觀

察及測量的結合之檢測試劑。第一區域可為樣本接收材料。第二區域可為分離器。第三區域可為毛細管床或顯示片。

【0030】 該裝置之特定元件或構件及該元件的特性或性質將如下文詳細地描述：

用於本裝置元件之材料

【0031】 樣本接收材料、分離器及毛細管床可由相同或不同材料所製。該材料為側流裝置及層析的技術領域中通常已知[參照參考文獻：EMD Millipore Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development, available from EMD Millipore, Billerica, MA]。薄膜是基於其物理及化學性質所選擇，其影響毛細管流且因此影響試劑沉澱及分析表現。該材料包括例如但不限於：硝化纖維素、濾紙、層析紙、纖維素、塑膠聚合物、非對稱聚砜類膜(asymmetric polysulfone membrane)、棉、棉絨及/或玻璃纖維、聚酯類、聚乙烯及聚砜類。該薄膜可由聚合物製成，該聚合物包括例如：硝化纖維素、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride)、尼龍(nylon)及聚醚砜(polyethersulfone)。該墊片材料通常使用作為樣本接收材料，以提供控制及均勻地接收樣本且助於其流至裝置中相鄰的條狀材料。墊片材料為多孔性的，通常由以下材料製成：纖維素(即濾紙)、玻璃纖維、編織網及合成的不織布材料或聚酯類。過濾基質特別在需要將包含於樣品中的外部材料與待分析之樣本部分分離時(例如，將細胞物質與流體分離出來時)，其可用於樣本接收。過濾基質可例如為：纖維素、非對稱聚砜類膜(包括但不限於 Vivid™ 血漿分離膜(Vivid™ Plasma separation membrane)及非對稱性亞微米(BTS)聚砜類膜(asymmetric sub-micron (BTS) polysulfone membrane))。吸

收墊可使用作為例如在裝置條之末端的芯片(wick)，以將樣本拉過側流片，且可增加分析的樣本量並增強分析靈敏度。吸收墊通常為纖維素或棉花絨且可基於床體積(bed volumn)的厚度、可壓縮性及均勻性來最佳地選擇。測試片整體可安裝於背襯卡上，其通常為塑膠背襯且黏合劑的卡片。如本文所述，雖然各種材料通常在側流裝置具有特定目的，但各材料可考慮本發明的接收材料、分離器及顯示片的目的而具有適當地特性。詳見材料的進一步討論之例子。

【0032】 用於測試片配置之其他材料，尤其是顯示片為側流技術及層析技術的技術領域中已知之材料。

本裝置之元件或構件

樣本接收材料(樣本墊)

【0033】 裝置之第一元件(以下略稱為樣本接收材料或樣本墊)作為海綿並保持用以測試的超量的樣本流體。接收材料吸收樣本，但亦容許其流動或吸附至下一個相鄰的材料。其通常對於存在於樣本中之目的蛋白以及檢測試劑(例如，染劑)為惰性，且因此不與其反應，以使蛋白質及檢測試劑經由材料而流動或吸附至側流裝置中的相鄰材料。

【0034】 樣本接收材料可浸入自哺乳動物或病患樣本中，或替代地，該樣本可間接或直接施用於樣本接收材料。樣本可藉由，例如：具刻度之滴管、吸量管、移液管、或可重複配給病患樣本之吸量管而施用於樣本接收材料。若樣本接收材料配置以浸入生物樣本(例如，參照第 5 圖)，則樣本接收材料可為相對較長(例如但不限於：約 10 mm)。若該樣本接收材料配置以接收藉由例如滴管或吸量管所施用的樣本時，則樣本接收材料可為相對較短(在約 5 mm 至約 10 mm

之間，但不限於此)。一般而言，該寬度可為約 2 mm 至 10 mm，且更常見為 2.5 mm 至 5 mm(± 0.5 mm)。樣本接收材料的長度及寬度的變化是可能的，且依據如片匣或外殼之大小以及生物樣本與檢測試劑充分混合之能力的因素。

【0035】 特別是，樣本接收墊作為毛細基質，其中生物樣本及檢測試劑(例如，染劑)可自由地混合。樣本墊亦可具有以乾燥型式之檢測試劑，其可適用於在分析物(例如，生物樣本內檢測之目的蛋白)與檢測試劑之間的最佳化化學反應。檢測試劑可預先載入於樣本接收材料上。在一實施例中，當加至樣本接收墊的生物樣本(例如，尿液)溶解檢測試劑時，接著樣本及檢測試劑染劑之混合物藉由流經測試墊至例如分離器的相鄰材料之方式通過該裝置。

【0036】 另外，樣本墊包含一系列之兩個或更多的樣本墊(參照例如第 4 圖)。例如，第一墊可接收樣本且第二墊可含有檢測試劑，因而生物樣本由第一元件(第一墊)遷移至含有乾燥型態之檢測試劑的第二元件(第二墊)，其可適用於目的的分析物與檢測試劑之間的最佳化化學反應。若使用兩個或更多的樣本接收材料，任其一可含有該檢測試劑。較佳地，第一樣本接收材料包含檢測試劑且第二樣本接收材料不含有檢測試劑。

【0037】 在另一實施例中，第一樣本墊接收生物樣本且被設計成分離出或留存可存在於該樣本中之不溶性材料。過濾的樣本其後流經第一樣本墊或至第二樣本墊且檢測材料已併入於第一樣本墊或第二樣本墊，且允許檢測試劑及樣本適當地混合。第二墊可具有與第一墊相同或不同的組成。

【0038】 再者，在另一實施例中，該第一樣本墊接收樣本且亦含有檢測試劑，而第二樣本墊用於在進入測試片的下一相鄰材料(例如，分離器)之前提供檢測試劑與關注分析物混合的額外時間。

【0039】 在一額外實施例中，樣本接收材料包含用於檢測試劑之基材且乾燥留存於基材上。檢測試劑可在樣本接收材料上或其之內。一但病患樣本被加入，則釋放檢測材料。該基材不吸收病患樣本或不與其反應，當施用時，其移動經由基質移動並至相鄰材料之上，例如，分離器。

【0040】 應值得注意的是，該樣本可例如經由樣本槽或用於接收樣本之裝置其他物件施用或放置進片匣或外殼。當測試片安裝或封裝於片匣或外殼內側時，樣本槽或物件可位於例如測試片的樣本接收材料之上(參照第 1 圖)。

【0041】 使用作為樣本接收材料或樣本墊之材料為側流裝置及層析的技術領域中已知之材料 [見參考文獻： EMD Millipore Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development, available from EMD Millipore, Billerica, MA] 且基於影響樣本接收、控制及均勻毛細管流及樣本過濾之物理性質及化學性質進行選擇。此外，若樣本接收材料亦含有檢測試劑，理論上，該材料為用於保持檢測試劑且當測試樣本加入時最佳化釋放的適當基質。該墊材料為多孔性的，通常由纖維素(例如：濾紙)、玻璃纖維、編織篩網及合成不織布材料或多孔性塑膠(例如：聚酯類)所製成。可使用作為樣本接收材料之其他材料例如為：非對稱聚砜類膜(polysulfone asymmetric membranes)、棉花/玻璃纖維材料如 Ahlstrom® 8950、塑膠聚合物膜，例如聚乙烯(例如，高密度聚乙烯)、聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene)以及多孔性玻璃纖維膜(參照例如 Porex，Fairburn，GA)。材料的進一步描述參照範例(即，範例 2 及範例 6)。

【0042】 應值得注意的是，當檢測試劑為具有對纖維素的親和性的染劑時，用於本發明之裝置的樣本接收材料可為存在足以與生物樣本中一或多個修飾目的蛋白質結合的檢測試劑之纖維素。更具體而言，該纖維素不可被容許與

針對結合至例如生物樣本中的一或多個折疊錯誤蛋白質之關注蛋白質的檢測試劑進行「外部競爭(out compete)」。替代地，若纖維素存在於與檢測試劑之反應性低於一或多個修飾的目的蛋白質之基質時，則纖維素使可用於樣本接收材料(本文中提到之纖維素定義為具有 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 化學式之有機化合物，且特別為由數百至數千的 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 鏈結 D-葡萄糖單元 (β linked D-glucose units)之直鏈所組成之多醣類)。

分離器

【0043】 接著，該流體(例如，樣本或與檢測試劑混合的樣本)自樣本分析材料或樣本墊流經過濾器(以下略稱為「分離器」)，其設計成可留存任何未結合之檢測試劑。特別是，分離器適用於分離側流裝置中的游離(free)檢測試劑(例如，染劑)與蛋白質結合之檢測試劑。具體而言，分離器材料容許樣本流流至下一個相鄰材料，但若生物樣本中不存在一或多個目的蛋白，則留存、阻礙未結合的檢測試劑的流動或與未結合的檢測試劑結合。

【0044】 分離器鄰接樣本墊，但較佳為與樣本墊重疊，其中樣本墊含有檢測試劑(例如，染料)或一系列之樣本墊元件(參照例如第 3 圖)。分離器之功能為分離以下兩者：與一或多個測試樣本蛋白或目的蛋白(例如，一或多個折疊錯誤蛋白質)結合之檢測試劑以及未與一或多個測試樣本蛋白質結合之檢測試劑，從而容許結合之檢測試劑流過分離器並留存未結合之檢測試劑於分離器。另外，分離器可為相同或不同材料的一系列的一或多個過濾器。

【0045】 不受理論束縛，分離器材料可含有用與檢測試劑的基材，以使未結合檢測試劑與分離器材料結合且無法流至下一材料。已與蛋白質結合之檢測

試劑不與分離器中之基材結合且流至測試片之下一材料。基材可為分離器材料(例如，纖維素)或可被化學修飾或外加至分離器材料。此外，分離器材料組成之結構特性提供未結合之檢測試劑的留存。

【0046】 此外，分離器亦可由重疊或連續的複數片材料所組成，以最佳化未結合檢測試劑之留存(見第 4 圖)。複數片可由相同或不同材料製成。可用於分離器的過濾器基質例如為纖維素、熱塑性聚合物，如非對稱聚砜膜(包括但不限於 Vivid™ 血漿分離膜及非對稱性亞微米 (BTS) 聚砜類膜 (asymmetric sub-micron (BTS) polysulfone membrane))。分離器材料之進一步描述請參照範例(例如，範例 2、範例 4、範例 5、範例 8、範例 13、範例 14 及範例 16)。

【0047】 實際上，出乎意料且非預料中的結果為，許多硝化纖維素材料作為分離器材料確實運作情況良好且容許尿液及與染劑結合蛋白質流經該裝置。例如：Whatman® AE99 硝化纖維素膜運作情形十分良好(見表 1)。亦有運作狀況大致良好之纖維素材料(例如：Ahlstrom® 601、319、247、Whatman® CF1、CF3、CF4；EMI11513、5475、5493)，但亦有部分纖維素材料表現不佳(例如：Ahlstrom® 270)。意外地，在允許蛋白結合 CR 染劑流動並留存未結合染劑方面表現良好的材料為 Vivid™ 血漿分離材料(Pall Corporation)及非對稱性亞微米(BTS)聚砜類膜(Pall Corporation)(參照表 1 及表 2)。

【0048】 當檢測試劑為如剛果紅的染劑時，分離器材料可為例如：濾紙、纖維素類型及/或如 EMI 11513、EMI 5475、EMI 5493、1281、642、標準 17(Standard 17)、C048、LF1、LF1、VF2、CF1、CF3、Ahlstrom 319 的材料。分離器可為例如約 5 至 10 mm 的長度，或其可為一系列的片，其中每個長度為 5 至 10 mm。

【0049】 在一實施例中，分離器留存游離的檢測試劑(例如，染劑)，但容許結合蛋白質染劑流過。在一特定實施例中，分離器包含纖維素且檢測試劑為剛果紅。

檢測試劑

【0050】 檢測試劑為與樣本中一或多個目的蛋白反應的物質。例如，檢測試劑可為與存在於哺乳動物之生物樣本(例如，病患之樣本)之一或多個折疊錯誤蛋白質(例如，嗜剛果紅性蛋白質)、聚集蛋白質及/或超分子聚集蛋白質反應或具有與其之結合親和性的物質。檢測試劑可被預載入於檢測墊上(例如，施用於試劑墊上，或試劑墊浸於檢測試劑或染劑)。試劑墊可為樣本接收材料或樣本接收墊。

【0051】 在一態樣中，檢測試劑為染色生物樣本中若存在的目的蛋白之子集合之染劑。在一實施例中，檢測試劑可與折疊錯誤的蛋白質反應。例如，染劑可為偶氮染劑(azo dye)，例如剛果紅(CR)，或緩衝或非緩衝的其類似物。再者，只要其他染劑具有對生物樣本或病患樣本內目的的折疊錯誤蛋白質、聚集蛋白質及/或一或多個超分子蛋白質的親和性(及可與其結合或反應)時，亦可使用作為檢測試劑。該染劑的例子包括但不限於剛果紅類似物，例如於下列出版物所述：Sellarajah S 等人，剛果紅類似物的合成及其抗病原性蛋白顆粒活性的評價，J Med Chem. 2004 Oct 21;47(22):5515-34 (Sellarajah S et al, Synthesis of analogues of Congo red and evaluation of their anti-prion activity, J Med Chem. 2004 Oct 21;47(22):5515-34)；以及 Hélène Rudyk 等人，篩選剛果紅及其類似物的預防瘙癢病感染細胞中 PrP-res 形成的能力，Journal of General Virology (2000), 81, 1155–

1164(Hélène Rudyk et al., Screening Congo Red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells, Journal of General Virology (2000), 81, 1155–1164)。該用於檢測一或多個折疊錯誤蛋白質之檢測試劑亦可例如為硫代黃素 T(Thioflavin T)。

【0052】 此外，在本發明之一態樣中，檢測試劑以乾燥型態存在於裝置中，但亦可以其他型態存在。該檢測試劑之型態適於當施用且允許與目的蛋白結合時，與樣本進行混合之最佳化。檢測試劑之型態為適於長期穩定度或裝置儲存壽命之型態。在一實施例中，乾燥檢測試劑為染劑。再者，染劑可為剛果紅且可為例如：0.1 μg 至 800 μg ，較佳為 0.2 μg 至 480 μg ，更佳為 1 μg 至 400 μg ，再更佳為 2.5 μg 至 120 μg 的量存在於裝置中。

【0053】 剛果紅(CR)(例如，緩衝及未緩衝)可預載入至樣本接收材料。例如，於套件生產時，剛果紅溶液可施用於材料並在其組裝及包裝前進行乾燥(參照第 2 圖及範例 6)。

【0054】 檢測試劑為可檢測的，即由裸眼可視或可藉由例如視覺檢驗及/或機械或電子讀取器檢查的其他方式檢測。

【0055】 本發明提供例如，於裝置生產或組裝期間，併入測試裝置的檢測試劑。其為對於檢測折疊錯誤蛋白質之習知裝置，需在加入測試前先混合染劑及生物樣本的改良。在一較佳實施例中，測試片包含含有檢測試劑的樣本接收材料。當生物樣本加至測試裝置的樣本接收材料時，其與樣本接收材料中的檢測試劑混合且生物樣本-接收試劑混合物流經裝置。

毛細管床(「顯示片」)

第 19 頁，共 47 頁(發明說明書)

【0056】 具有或沒有蛋白質結合檢測試劑(protein-bound-detection reagent)之樣本(例如，尿液)流經分離器並至毛細管床上(以下略稱為「顯示片」)並進行累積。因此，顯示片容許樣本向上流至測試片並顯示檢測試劑之存在與否。具體而言，顯示片容許樣本向上流至測試片並顯示檢測試劑結合分析物的存在與否。檢測試劑或結合試劑其後可藉由人類或機械手段視覺化(以獲得定性結果)及/或進行測量(即，半定量或定量)。當目的蛋白存在時，顯示片最佳地提供整體樣本之均勻流動及檢測試劑的相對均相顯示(homogeneous display)。在部分實施例中，與顯示片上的檢測試劑的強度或濃度可對應至該樣本中目的蛋白的量。在另一實施例中，檢測試劑向上流至顯示片之距離可指示生物樣本內目的蛋白量。此外，檢測試劑的強度及流上顯示片上的距離兩者可指示樣本內目的蛋白的濃度。再者，在檢測折疊錯誤蛋白質聚集體或超分子聚集體的情況下，檢測試劑的強度及流上顯示片的距離兩者可指示樣本內存在之蛋白質聚集體的大小。適當的毛細管床的材料包括例如硝化纖維或層析紙。再者，非對稱聚砜類膜亦可提供適當的顯示片。其他適當的材料包括 CytoSep® 膜，如 CytoSep® 1660 及 MN-260。如下所述，側流片的毛細管床對準側流片之片匣或外殼之結果觀測窗。材料的進一步細節參照範例 (例如，範例 2、範例 3 及範例 9)。若蛋白質結合檢測試劑存在，則檢測試劑於結果觀測窗內可視化(見第 1 圖)。

芯片

【0057】 可選擇地，該裝置含有芯片。該芯片可位於本發明之測試片或裝置中的第三區域或顯示片之後。當其使用時，施用至該裝置之生物樣本(例如，流體)持續自顯示片遷移至最終多孔性吸收材料，「芯片」，其作為樣本累積器

且亦有將樣本沿測試片拉動之功能。吸收墊可使用作為例如在該裝置條末端之芯片，以拉動樣本拉經過側流片，且可增加分析的樣本量以及增強分析靈敏度。吸收墊通常為纖維素或棉花絨且可基於床體積的厚度、可壓縮性及均勻性來最佳地選擇。

背襯卡

【0058】 該裝置可具有背襯卡。測試片整體可安裝於背襯卡(例如：可自 Lohmann，Orange，VA 購得)上，其通常為塑膠背襯卡及黏合劑。

外殼/片匣

【0059】 在本發明中之一實施例，該診斷裝置被容納、裝入(encase)或封裝於外殼或片匣。該裝置可進一步包含外殼或片匣，其包括但不限於配置成包裝該裝置為目的之匣狀物、塑膠裝置或擠製塑膠片。數種通常的片匣外殼為商業上可購得(例如：從 Kanani Biologicals、Gujarat、India 或 EASE-Medtrend Biotech LTD，Shanghai，中國)或可依目的以現有材料客製(參照例如，美國設計專利申請序號 No. 29/533,647.)。該裝置可配置成具有樣本槽之外殼或片匣，以用於接收樣本，其中當樣本槽安裝/容納於片匣內時，樣本槽位於測試片之樣本接收材料之上。此外，該裝置可被配置以安裝於外殼或片匣中時，測試片的顯示片或毛細管床位於外殼之結果觀測窗之下。

【0060】 在一實施例中，本發明之裝置亦包含可定量結果，例如毛細管床上(即，在結果視窗中)之檢測試劑的強度(例如，染劑)之電子讀取器，及亦可進一步包含顯示結果的顯示螢幕(例如，LED 螢幕)。該讀取器可為外殼的一部份，

或與外殼一體成形之元件，例如，在該結果顯示窗中。此讀取器例如在 Venkatraman, Biosensors and Bioelectronics Volume 74, 15 December 2015, Pages 150–155、PCT 申請號 WO2013083686 A1、PCT 申請號 WO2004010143 A2 以及 PCT 申請號 WO2006010072 A2 中所描述。

覆蓋帶

【0061】 具有或沒有外殼之裝置可更進一步包含蓋體，如保護性膠帶(例如，可自 Lohmann, Orange, VA 購得)或可保護該裝置不受損壞且可提供正常讀取測試結果之其他材料。例如，該裝置可配置成作為測桿(dipstick)使用(例如，尿液測桿)。在本實施例中，側流片可以保護性膠帶覆蓋(參照第 5 圖及範例 11)。

執行控制組試劑

【0062】 在一較佳實施例，在該裝置使用前，控制組試劑可存在於毛細管床上且可視於觀測窗(參照第 1 圖及第 2 圖、範例 12)。當該生物樣本(例如，流體)流經毛細管床，控制組試劑溶解，控制組試劑線散布及/或帶走控制組試劑至顯示片，以使結果觀測窗內不會看到控制組試劑，或其為模糊、或為可看到或測量的其他部份變化。在觀測窗內之控制組試劑之變化指示測試樣本(例如，流體)已被加入且已正常的通過該裝置，例如作為執行控制組(參照範例 12)。控制組試劑為例如藉由裸眼或其他檢測或測量方式(例如，藉由機械檢驗及/或電子讀取器)而可視覺上檢測。在一實施例中，控制組試劑為酒石黃(tartazine)。作為執行控制組試劑使用之其他染劑包括食用藍色 1 號-亮藍色 FCF, E133 (藍色色澤)(FD&C Blue No. 1 – Brilliant Blue FCF, E133 (blue shade))、食用藍色 2 號-靛

藍，E (靛藍色色澤) (FD&C Blue No. 2 – Indigotine, E (indigo shade))、食用綠色 3 號-固綠 FCF，E143-(綠松石色澤)(FD&C Green No. 3 – Fast Green FCF, E143 (turquoise shade))、食用紅色 7 號-赤蘚紅，E127 (粉紅色澤)(FD&C Red No. 3 – Erythrosine, E127 (pink shade))、食用紅色 40 號-誘惑紅 AC，E129 (紅色色澤) (FD&C Red No. 40 – Allura Red AC, E129 (red shade))、食用黃色 4 號-檸檬黃，E102(黃色色澤) (FD&C Yellow No. 5 – Tartrazine, E102 (yellow shade))及食用黃色 5 號-日落黃 FCF，E110 (橙色色澤) (FD&C Yellow No. 6 – Sunset Yellow FCF, E110 (orange shade))。

檢測目的蛋白

【0063】 如前述，本發明為關於一種裝置及利用該裝置檢測關注蛋白質，更具體而言為折疊錯誤蛋白質、聚集的蛋白質及/或超分子蛋白質聚集體之方法。 α 螺旋(alpha helix)已知為天然構形之功能蛋白質的突出結構性模體 (prominent structural motif)。反之，蛋白質的構形改變可能導致 β 褶板結構模體 (即， β 褶板結構)或折疊錯誤蛋白質其後傾向於導致蛋白質聚集與毒性。折疊錯誤蛋白質可因此成為蛋白質聚集體或超分子聚集體的形式且可與折疊錯誤蛋白質疾病相關，如子癇前症、阿茲海默症、傳染性蛋白顆粒疾病(prion disease)及帕金森氏症。

【0064】 具體上，與子癇前症相關且藉由本發明的裝置及方法所檢測之折疊錯誤蛋白質、蛋白質聚集體及/或超分子聚集體可包括但不限於例如： $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 (alpha-1 antitrypsin)(Serpina1)、血漿銅藍蛋白 (ceruloplasmin)、重鏈 IgG、輕鏈 IgG、可誘導干擾素蛋白質

6-16(interferon-inducible protein)(IF-16-6, G1P3)、白蛋白(albumin)，以及各蛋白質之斷片、其混合物，以及該混合物之斷片。該蛋白質具有與本發明裝置使用之檢測試劑的結合親和性(如下文所述)。例如，折疊錯誤蛋白質為嗜剛果紅性，具有對稱為剛果紅等的染劑的親和性。

【0065】 本發明之裝置亦可用於檢測子癰前症以外的蛋白折疊錯誤疾病。例如，該裝置可用於檢測折疊錯誤蛋白質疾病及症狀之折疊錯誤蛋白質，該折疊錯誤蛋白質疾病及症狀例如為阿茲海默症、大腦 β 類澱粉血管病變(Cerebral beta-amyloid angiopathy)、青光眼之視網膜神經節細胞退化(Retinal ganglion cell degeneration in glaucoma)、傳染性蛋白顆粒疾病、帕金森氏症及其他突觸核蛋白病(synucleinopathies)、tau 蛋白病變(Tauopathies)、額顳葉退化症(Frontotemporal lobar degeneration, FTLT)、FTLT-FUS、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease)及其他三重、重複疾病、失智症(Dementia)(家族性英國及丹麥失智症(familial British and Danish))、遺傳性腦出血合併類澱粉病變(Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis)、體顯性腦動脈血管病變合併皮質下腦梗塞及腦白質病變(CADASIL)、亞歷山大氏症(Alexander disease)、各種類澱粉病變(amyloidosis)、Serinopathies、第二型糖尿病(Type II diabetes)、包涵體肌炎/肌肉病變(Inclusion body myositis/myopathy)、白內障(cataracts)、色素性視網膜炎合併視紫紅質突變(Retinitis pigmentosa with rhodopsin mutations)、甲狀腺髓質癌(Medullary thyroid carcinoma)、垂體催乳素腺瘤(Pituitary prolactinoma)、遺傳性格子狀角膜營養不良(Hereditary lattice corneal dystrophy)、麥洛利氏小體(Mallory bodies)、肺泡蛋白質沉著症(Pulmonary alveolar proteinosis)、牙源性類澱粉瘤(Odontogenic tumor

amyloid)、囊性纖維變性(Cystic fibrosis)、鐮刀型貧血症(Sickle cell disease)以及重症肌肉病變(Critical illness myopathy)。

生物樣本

【0066】 待檢測之一或多個目的蛋白可自哺乳動物之生物樣本發現。生物樣本可例如為自乾淨或自然蒐集所取得之尿液、腦脊髓液、羊水或可能包含一或多個目的蛋白之任何體液樣本(例如，血液、唾液、羊水、腦脊髓液、血漿或血清)。該樣本亦可為自病人之分泌物之萃取物，例如：從鼻腔分泌物、排泄物、或耳垢、或以適當的溶液中萃取之組織試樣並施用至該裝置。目的蛋白可從例如懷孕或產後哺乳動物之生物樣本中發現。

病患

【0067】 該病患可為哺乳動物。此外，哺乳動物可為懷孕個體，例如：懷孕婦女、懷孕靈長類動物或例如利用實驗研究而設置成具有子癰前症的身體症狀及病徵的基因工程改造動物模式(例如，高血壓及尿蛋白)。較佳地，為了診斷子癰前症，該病人可為任何懷孕婦女。該懷孕婦女可為被懷疑患有子癰前症或處於罹患子癰前症之風險。例如，該懷疑可基於以下理由：(1) 出現如美國婦產科醫生學會(ACOG)所訂立之子癰前症之病徵與症狀(懷孕中高血壓，美國婦產科醫生學會專案組於懷孕中高血壓的報告，婦產科 122，122 卷，第 5 號，2013 年 11 月)，具體而言，例如表 E-1(ACOG 2013 準則)及/或(2)具有一或多個子癰前症之風險因子(例如，過去懷孕時患有子癰前症之婦女、多胞胎身孕之婦女、患有心血管或腎臟異常之婦女或患有自體免疫疾病(如紅斑性狼瘡)的婦女)。

套件

【0068】 本發明亦包含用於檢測樣本的目的蛋白之套件。在一實施例中，該套件包含檢測與子癰前症相關的折疊錯誤蛋白質之裝置，該蛋白質存在於懷孕哺乳動物之樣本。該套件包含上述任何替代實施例中的本發明之裝置。該套件亦可包含將病患樣本施用至樣本接收材料之手段，例如：吸量管(例如，自 Genesee Scientific，San Diego，CA 可購得之細尖移液管)或滴管、控制組及該裝置的使用說明書。因此，該裝置不僅可以單獨實體(stand-alone entity)使用，其亦可以套件形式使用，其在部分臨床或非臨床環境上可具有更多優點。該套件可被包裝在箔袋或聚酯膠膜袋。此外，套件袋可為單獨包裝，或各包裝為多個，例如 2、5、10、15、25、50 或 100 組套件。

裝置使用環境及裝置使用方法

【0069】 本發明之裝置可用於例如臨床實驗室(於醫院內的環境或醫院外的環境)、立即性照護環境、醫師室實驗室(physician office laboratories)、急診部門(例如，醫院內)或近病人端檢驗(near-patient testing)或由醫務人員、非醫務人員甚至是病患為人類時由病人本身的之定點照護(point-of-care)裝置。此外，該裝置可與其他診斷分析組合使用(例如，檢測與子癰前症相關之蛋白質(即生物標記)如 sFlt-1、PlGF、PP-A、PP13、正五聚蛋白(pentraxin)、抑制素-A(inhibin-A)及可溶之內皮因子(endoglin)之免疫分析)及/或通常使用於診斷子癰前症之方法或觀測(例如：血壓讀數、用於診斷子癰前症之臨床測試包括血小板計數、血清肌酸酐濃度、血清丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransferase，ALT)及天冬胺酸轉

胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)), 及其他病徵或症狀, 如體重增加、暈眩、頭痛、視線模糊等。

【0070】 舉例而言, 本發明包括診斷子癇前症之方法或在患有妊娠高血壓疾病或被懷疑可能罹有子癇前症的病人進行鑑別診斷之方法, 該方法包含下列步驟: a) 測定懷孕病患的血壓, 其中血壓高於 140/90 mm/Hg 之懷孕病患可指示該懷孕病患之子癇前症及 b) 施用來自病患的生物樣本至本發明之裝置, 因而病患的生物樣本中至少一目的蛋白的檢測提供或支持病患的子癇前症診斷或作為鑑別診斷。

【0071】 再者, 本發明亦包含治療懷疑患有子癇前症之懷孕哺乳動物的方法, 其包含下列步驟: a) 施用由哺乳動物之生物樣本至本發明之裝置, 以測定至少一蛋白質的存在, 該至少一蛋白質指示懷孕哺乳動物患有子癇前症; 以及 b) 使懷孕哺乳動物進行分娩以治療子癇前症。此外, 該裝置亦可用於分娩後, 以測定該病患之生物樣本內是否表現一或多個折疊錯誤蛋白質。若一或多個折疊錯誤蛋白質存在, 則病患可需更進一步的管理或治療性介入(例如, 硫酸鎂 (magnesium sulfate) 及其他抗高血壓劑的施予) 以治療子癇前症, 或病患可利用本發明之裝置監控, 以指示何時生物樣本內不再檢測到該蛋白質。另外, 本發明之裝置可於治療上介入後使用, 以測定治療是否成功或測量存在於生物樣本內的目的蛋白的量或存在的變化(例如, 減少、移除或增加)。因此, 本發明之裝置可用於病患的治療前及治療後, 以測定是否需要進一步治療性介入、測定治療性介入是否有效及/或是否需施予治療性介入的替代形式或增加治療劑之劑量, 以解決子癇前症或其他蛋白質折疊錯誤疾病。

裝置優點及裝置使用的方法

【0072】 本發明之裝置至少因以下理由優於習知裝置：1) 該裝置提供較少步驟的簡易測試流程；2) 該裝置提供用於最佳化生產的標準測試材料的使用；3) 該裝置提供測試套件內之檢測試劑的改善穩定性，以提供更長的保存期限；4) 結果更簡單且更容易判讀；5) 保持相對低的成本；以及 6) 提供適用於定點照護使用或用於臨床實驗室環境的快速結果。

【0073】 具體上，提供的裝置及方法遠優於習知用於檢測可能的子癰前症的試紙套件(參照例如，美國專利申請公開號 No. 20150291115)，亦即提供的裝置對於使用者需要更少的步驟，結果更易於判讀且其比試紙套件更為穩定並擁有至少 6 個月的長期保存期限，較佳為 1 年，更佳為 2 年，再更佳為 3 年，再更佳為 4 年，及再更佳為 5 年。本發明之裝置亦提供快速結果(即，由施用生物樣本(如尿液)至該裝置的 3 分鐘以內，較佳為 2 分鐘以內，更佳為 1 分鐘以內或更短時間內)，以適合訓練最少的定點照護用戶使用。

【0074】 本發明可藉由下列的非限定範例進行說明：

範例

範例 1

樣本裝置

【0075】 第 1 圖呈現位於片匣或外殼中的本發明之裝置測試片之照片。第 1 圖的左側描繪在與生物樣本接觸之前外殼中的裝置。第 1 圖的右側呈現該裝置測已知與子癰前症相關之折疊錯誤蛋白質為陰性、弱陽性及陽性之尿液樣本的結果。

【0076】 第 2 圖呈現本發明之裝置之測試片實施例之範例。測試片包含控制組染劑、顯示片、分離器(例如，三片材料)、第二樣本墊、第一樣本墊及於樣本墊上乾燥之染劑。

【0077】 第 3 圖呈現本發明之診斷裝置之實施例。第 3 圖 A 部分呈現俯視圖。第 3 圖 B 部分呈現從側面觀看第 3 圖 A 部分之相同實施例。該樣本墊、分離器及顯示片可為彼此對接。第 3 圖 C 部分呈現彼此重疊的樣本墊、分離器及顯示片之實施例(側面圖)。

【0078】 第 4 圖顯示於測試片內之不同材料配置。第 4 圖 A 部分呈現依序具有兩個樣本墊、分離器及顯示片(毛細管床)的本發明之替代實施例。各片具有與相鄰片的重疊。第 4 圖 B 部分呈現具有依序重疊的兩個樣本墊、三重分離器及顯示片之本發明的另一替代實施例，其各片具有與相鄰片的重疊。

【0079】 第 5 圖呈現本發明的測試片的量桿配置之範例。此實施例於測試片之頂部上配置有覆蓋帶。在測試片之頂部，覆蓋帶為不透明顏色且可用於支持測試片。於該測試片之中間部，覆蓋帶為透明以提供用於結果的觀測窗。覆蓋帶可被配置使透明觀測窗之位置於例如分離器之上的約 10 mm。該觀測窗之覆蓋帶可由顏色(例如，白色)所環繞，以易於觀測結果。於分離器之下，覆蓋帶為不透明顏色以覆蓋分離器。於該測試片之底部，覆蓋帶可顯示以指示利用何端浸入測試樣本中的箭頭，且可顯示以指示測試片浸入樣本時之最大程度的線。於測試片的尾端可沒有覆蓋帶，以便於浸入時測試樣本的吸附。

範例 2

材料測試

【0080】 各種類似紙材料用於測試自懷孕婦女的尿液樣本辨別罹患或未罹患子癰前症的能力。剛果紅(CR)染劑(Sigma. St. Louis, MO)加入至尿液樣本且將一滴加入至材料，以評估適合用於樣本接收、分離器及顯示片的特性。結果點漬在約 3 分鐘後可視化，並於子癰前症患者及正常控制組孕婦之尿液之間的視覺差異(表 1)。結果「優良(excellent)」代表材料適合提供子癰前症患者的 CR 尿液與正常孕婦病患之 CR 尿液之間的可視覺觀察差異，因而材料可使用於診斷測試裝置。結果「不佳(poor)」代表材料不適合提供 CR-子癰前症陽性與 CR-控制組尿液之間的可視覺觀察差異。在結果評分表上，結果「不佳(poor)」為最不適合之材料，「微妙(subtle)」為稍佳但不理想，「可(okey)」為較佳，「良好(good)」為更佳，「佳(better)」為更提升且「優良」為最適當之材料。非對稱聚砒類膜被認為提供最佳結果。部分棉花材料如 CF3 及 CF4 效果良好，但其他棉花材料，如 Ahlstrom 270 則效果不佳。硝化纖維及玻璃纖維材料普遍在此用途下效果不佳。

[表 1]

製造商	材料	組成	結果
Pall Corp, Port Washington, New York	Vivid	非對稱性聚砒類	優良
Pall Corp	BTS	非對稱性聚砒類	優良
Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA	AE98	硝化纖維	可

Whatman	AE99	硝化纖維	佳
Whatman	FF120	塑膠上之硝化纖維	良好
Whatman	FF170HP	塑膠上之硝化纖維	不佳
Whatman	FF85	塑膠上之硝化纖維	微妙
Whatman	FF80HP	塑膠上之硝化纖維	微妙
Whatman	Prima 40	硝化纖維	可
Whatman	Prima 125	硝化纖維	較不佳
Whatman	Immunopore RP		微妙
Whatman	Standard 14	玻璃纖維	不佳
Whatman	Standard 17	玻璃纖維	不佳
Whatman	CF3	棉花	可
Whatman	CF4	棉花	可
Whatman	VF2		不佳
Whatman	LF1		微妙
Millipore, EMD Millipore, Billerica, MA	HF75	硝化纖維	中等
Millipore	HF90	硝化纖維	中等
Millipore	HF120	硝化纖維	不佳
Millipore	HF135	硝化纖維	不佳
Millipore	HF170	硝化纖維	不佳
Millipore	HF180	硝化纖維	不佳
Sartorius Stedim, Bohemia, New York	CN150	硝化纖維	微妙

Sartorius Stedim,	CN140	硝化纖維	微妙
Sartorius Stedim,	CN95	硝化纖維	微妙
Ahlstrom, Helsinki Finland	270	棉花	不佳
Ahlstrom	222		不佳
Ahlstrom	320		不佳
Ahlstrom	111	玻璃	不佳
Ahlstrom	142	玻璃	不佳
Ahlstrom	21		不佳
Ahlstrom	141	玻璃	不佳
Ahlstrom	6613	玻璃或聚酯類	不佳
Ahlstrom	6615		不佳
Ahlstrom	181		不佳
Ahlstrom	169		不佳
Ahlstrom	161		不佳
Ahlstrom	151		不佳
Ahlstrom	131		不佳
Ahlstrom	601	棉花	良好
Ahlstrom	237		可
Ahlstrom	238	棉花	微妙
Ahlstrom	8950	棉花或玻璃	不佳
Ahlstrom	8951	玻璃纖維或聚酯類	不佳
Ahlstrom	8964	玻璃纖維	不佳

Ahlstrom	CytoSep 1662	專屬(Proprietary)	良好
Ahlstrom	CytoSep 1663	專屬	良好
Ahlstrom	CytoSep 1660	專屬	良好
Ahlstrom	ReliaFlow 319		微妙
Ahlstrom	ReliaFlow 800		不佳
Ahlstrom	ReliaFlow 1281		微妙
Macherey Nagel Bethlehem, PA	MN-260		良好
Macherey Nagel	MN-321		微妙
Macherey Nagel	MN-615		良好
Macherey Nagel	MN-616g		可
Macherey Nagel	MN-640		可
Macherey Nagel	MN-6176		可
Lypore Rochester, NH	9334		不佳
Lypore	9390		不佳
Lypore	9389		不佳

範例 3

測試片

【0081】 由於 BTS 及 Vivid 在提供子癩前症患者之 CR 尿液與控制組孕婦病患之 CR 尿液之間的可視覺觀察差異呈現優良結果，因而測試片由 Ahlstrom[®] 8950 (棉花/玻璃纖維組成物，8950)樣本墊及 BTS 或 Vivid[™] 執行片或毛吸管床所組成。剛果紅加入至尿液樣本，並將樣本渦流震盪，其後將樣本施用於測試

片之 8950 端。於 BTS 或 Vivid™ 膜執行片上觀察結果。罹患子癇前症之婦女尿液施用至含有測試片的 Vivid™ 膜而產生非常清晰訊號(剛果紅染色的粉紅/紅)之結果，且陰性尿液則無訊號。該訊號為依據體積，隨著體積減少則訊號亦減少。在陽性及陰性尿液在較大樣本體積下皆產生陽性染色，而使 BTS 片顯示其之間無差異。隨著減少施用的樣本體積，而同樣地減少對於陽性或陰性尿液的訊號。

[表 2]

執行材料	陽性尿液	染色結果	陰性尿液	結果
Vivid	90 µL	陽性	90 µL	陰性
Vivid	50 µL	弱陽性	50 µL	陰性
Vivid	30 µL	陰性	30 µL	陰性
BTS	90 µL	陽性	90 µL	陽性
BTS	50 µL	弱陽性	50 µL	弱陽性
BTS	30 µL	陰性	30 µL	陰性

以上結果表示 Vivid™ 材料適用於本發明之診斷測試裝置之材料，而 BTS 則執行不佳。

範例 4

分離器材料評估

【0082】 Vivid™ 及 BTS 膜被評估作為位於樣本墊與執行片(即毛細管床或顯示片)之間的分離器材料，以測定當施用陰性尿液(即，由未罹患子癇前症婦

女之不含目的蛋白之尿液)時是否有助於 CR 染劑之留存，且允許具有子癰前症陽性尿液之 CR 流經至顯示片。測試片組裝以包含作為樣本墊的 8950，其具有 Vivid™ 膜或 BTS 膜，隨後為 CytoSep® 1660 執行片。加入 CR 的尿液施用於 8950 且於 CytoSep® 1660 執行片上觀察結果。

【0083】 當施用陽性尿液(即，由罹患子癰前症婦女之含有目的蛋白的尿液)-剛果紅染劑時，於所有條片上觀察到染色。當施用陰性尿液-剛果紅時，由 Vivid™ 膜分離器所製之條片為陰性，且由 BST 膜分離器所製之條片呈現部分染劑染色。Vivid™ 材料為有效的分離器，以在陰性尿液進行測試時，其可留存 CR 染劑，而在陽性尿液進行測試則可通過 CR 染劑。BTS 為效果不佳的分離器。

範例 5

用於測試片內預載入檢測試劑的材料評估

【0084】 剛果紅染劑施用於樣本墊材料並使其乾燥。施用陽性尿液並觀察染劑自樣本墊釋放之結果。

[表 3]

材料	結果
POREX® 4894 (Porex, Fairburn, GA)	良好的染劑釋放及流動
Porex® X-4897	良好的染劑釋放及流動
Porex® D3883B	中等的染劑釋放，仍留存點漬。
Porex® PVA	不佳的染劑釋放，不流動

Fusion 5-1 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh PA)	中等的染劑釋放，仍留存點漬。
Fusion 5-2 (GE Healthcare Life Sciences,)	中等的染劑釋放，仍留存點漬
GF DVA 1 (GE Healthcare Life Sciences,)	不佳的染劑釋放
GF DVA 2 (GE Healthcare Life Sciences,)	不佳的染劑釋放
Whatman [®] 33 (GE Healthcare Life Sciences,)	中等的染劑釋放，仍留存點漬

【0085】 該檢測試劑(即，此例子的染劑)理想上為當生物樣本(即，尿液)施用時，自樣本墊材料中釋放。部分材料包括 POREX[®] 4894 及 Porex[®] X-4897 提供良好的染劑釋放且因此其高度適用於診斷測試裝置。此外，部分材料亦提供染劑釋放且可適用，例如 Fusion 材料(玻璃微纖維)及 Whatman[®] 33。

範例 6

具有併入測試片之染劑之樣本墊評估

【0086】 包括浸漬有剛果紅染劑之 Porex[®] X4897 及 POREX[®] 4894 之樣本墊材料併入至測試片，該測試片具有 Vivid[™] X 分離器及 MN-260 執行或顯示片。尿液加入至各條片之樣本墊且 MN-260 顯示片上觀察結果。

【0087】 結果：當加入尿液時，樣本墊材料釋放染劑。加入子癇前症陽性尿液產生 MN260 材料的陽性染色。在大多數的情形，加入子癇前症陰性尿液產生 MN260 材料的無染色結果；然而在部分情形，於 MN-260 片的起始仍有部分染色。以上結果顯示 Porex[®]、Vivid[™] X 及 MN260 材料之配置可提供用於辨別子癇前症陽性尿液及子癇前症陰性尿液，以提供有用的診斷測試裝置。

範例 7

側流分析片匣內之測試片評估

【0088】 條片係由置於 Fusion 5 之上的浸有染劑 POR-4899 樣本墊，隨後為作為分離器的 Vivid™ X 膜，接著為 MN-260 顯示片所組成。該條片置於通用片匣內，並且樣本墊直接位於片匣之樣本注入口下且 MN260 芯片可見於片匣的結果觀測窗。75 µL 的尿液被加入至樣本注入口且結果可於結果觀測窗觀察。當加入陽性尿液時，可於結果觀測窗觀察到紅色染色，而當加入陰性尿液時，則不會觀察到染色。該配置提供用於辨別子癰前症陽性及子癰前症陰性之尿液之有效的診斷裝置。

範例 8

改良分離器

【0089】 有時，在條片上測試之陰性尿液在結果片上造成部分條紋，特別是時間過長時。因此評估額外的分離器配置，以觀察是否可實現陽性樣本與陰性樣本的較佳分離，及是否可排除陰性尿液的條紋。條片係由置於 Fusion 5 之上的浸有染劑 POR-4899 樣本墊、兩個錯置但重疊層之 Vivid™ X 分離器以及 MN260 顯示片所組成。當其施用陰性尿液進行測試時，雙層分離器避免染劑洩漏及條紋，因而提供用以辨別子癰前症陽性及子癰前症陰性之尿液之改善的診斷測試裝置。

範例 9

裝置片配置

【0090】 POR-4899 使用運動分配機(Kinematic dispensing machine)分配 6μl/cm 之剛果紅染料進行條紋化。POR-4588 則以 4μl/cm 進行條紋化。墊片於 37 °C乾燥 1 小時並保存於防潮箱。測試片由條紋化 POR 材料、一層 Vivid™ X 分離器及 MN-260 所組成。POR-4899 片於進行尿液測試時效果良好；然而，當含有 POR-4588 之條片進行陰性尿液測試時，於顯示片上產生染劑洩漏。當 POR-4588 以 4μl/cm 條紋化時進一步的評估，則產生乾淨的陰性尿液運行。其後，POR-4588 以 6 μl/cm 或 8 μl/cm 條紋化並與雙層 Vivid™ X 分離器組成來進行評估。與 6μl/cm 染劑片組成之條片於陰性尿液測試時得到最佳結果，且於陰性尿液測試時具有最低量的染劑洩漏及條紋。進一步地，具有 3 層 Vivid™ X 分離器且以 8μl/cm 條紋化之 POR-4588 的評估得到良好結果及較強的陽性訊號。

[表 4]

染劑墊	剛果紅分配比例	分離器	陽性/陰性辨別
POR-4899	6 μl/cm	單層 Vivid™ X 分離器	√
POR-4588	4 μl/cm	單層 Vivid™ X 分離器	偽陽性
POR-4588	6 μl/cm	雙層 Vivid™ X 分離器	√
POR-4588	8 μl/cm	雙層 Vivid™ X 分離器	√

【0091】 以具有施用 8μl/cm 之剛果紅的 POR-4588 及雙層 Vivid 分離器所配置之裝置於測試子癰前症陰性尿液時呈現乾淨的陰性結果，且於測試子癰前症陽性尿液時呈現強陽性結果，因此其為較佳的診斷測試裝置配置。

範例 10

測桿型測試設計之評估

【0092】 測試片是利用在 6 μ l/cm、8 μ l/cm 及 10 μ l/cm 條紋化之 POR-4588 與三層 Vivid™ X 分離器及 MN-260 所組成。條片浸入至 60 μ L 之尿液。該尿液成功地被吸附上該條片，且以 8 μ l/cm 條片的方式提供最佳的陽性測試結果及乾淨的陰性測試結果。因此，診斷測試裝置之適當測桿形式可以此方式配置且其可將子癰前症陽性及子癰前症陰性之尿液的辨別使用於診斷目的。

範例 11

診斷測試裝置配置之進一步評估

【0093】 由兩個 Porex® 樣本墊，其一有染劑條紋；三層 Vivid™ X 分離器以及 MN260 所製成的測試片於片匣/外殼中進行測試且作為用於測試尿液的測桿。該片匣外殼可能因控制樣本於樣本墊的中心點上的流動、良好的染劑吸收、向上流至條片的中心、及執行片染色結果更均質而改善了結果。5 個陰性尿液皆測試為陰性；5 個陽性尿液樣本得到 2 個弱陽性、3 個陽性結果。作為測桿型，測試片置入於測試管內 100 μ l 尿液中。在 3 分鐘時，所有陽性及陰性尿液的結果陰性。然而，在給予更多時間後，至 5 分鐘時的陽性尿液結果為 2 個弱陽性、3 個陽性，而陰性尿液仍為陰性。因此，此測試配置皆適用於子癰前症診斷測試裝置。

範例 12

執行控制組之評估

【0094】 本實驗之目的為探討指示何時樣本成功地跑上(run up)測試片之控制組，即「執行控制組(run control)」。當陰性生物樣本進行測試且於顯示片或結果片上沒有觀察到染色時，是難以告知其為陰性結果或測試沒有正確地執行(即，發生沒有確實加入樣本、加入的樣本不足或吸附上條片的樣本不足)。當水溶性著色的條紋噴佈於執行片材料上，並定位以在組裝於外殼時，其將可見於外匣結果觀測窗之頂部。利用樣本經由樣本注入口施加至樣本墊並可經由結果觀測窗進行觀察。當樣本到達控制組染劑條紋時，溶解該條紋並與樣本一起進行。執行控制組條紋的消失提供簡易的視覺指標，以指示該樣本已成功流過條片。控制組不干擾尿液測試的判讀結果。控制組條紋染劑之一例為酒石黃。可作為執行控制組之其他染劑包括：食用藍色 1 號-亮藍色 FCF，E133(藍色色澤) (FD&C Blue No. 1 – Brilliant Blue FCF, E133 (blue shade))、食用藍色 2 號-靛藍，E132(靛藍色色澤) (FD&C Blue No. 2 – Indigotine, E132 (indigo shade))、食用綠色 3 號-固綠 FCF，E143-(綠松石色澤) (FD&C Green No. 3 – Fast Green FCF, E143 (turquoise shade))、食用紅色 7 號-赤蘚紅，E127(粉紅色澤) (FD&C Red No. 3 – Erythrosine, E127 (pink shade))、食用紅色 40 號-誘惑紅 AC，E129(紅色色澤) (FD&C Red No. 40 – Allura Red AC, E129 (red shade))、食用黃色 4 號-檸檬黃，E102(黃色色澤) (FD&C Yellow No. 5 – Tartrazine, E102 (yellow shade))及食用黃色 5 號-日落黃 FCF，E110(橙色色澤) (FD&C Yellow No. 6 – Sunset Yellow FCF, E110 (orange shade))。

範例 13

分離器的替代材料的探討

【0095】 測試片由兩個 Porex[®] 樣本墊，其第一樣本墊以剛果紅(CR)染劑條紋化；如表 5 所示的各種替代分離器材料；以及 MN-260 執行片所組成。陰性尿液樣本於組合測試片上進行測試且評估各分離器之以下能力：1) 留存樣本內不存在目的蛋白時的 CR 染劑的能力以及 2)不留存結合 CR 的蛋白質之 能力。

[表 5]

分離器材料	陰性樣本的測試結果	陽性樣本的測試結果
EMI 11513 (EMI Specialty Papers, Redding, CT)	陰性，少量染劑流失	陽性
EMI 5475 (EMI Specialty Papers)	陰性，極少量染劑流失	陽性
EMI 5493 (EMI Specialty Papers)	陰性，少量染劑流失	陽性
ReliaFlow 1281	陰性，少量染劑流失	陽性(條狀)
Ahlstrom 642	陰性，極少量染劑流失	陽性
Whatman [®] Standard 17	陰性，中量染劑流失	陽性(條狀)
Millipore C048	陰性，極少量染劑流失	弱陽性
Whatman [®] LF1	陰性，少量染劑流失	弱陽性
Whatman [®] VF2	陰性，極少量染劑流失	弱陽性
Whatman [®] CF1	陰性，少量染劑流失	陽性
Whatman [®] CF3	陰性，極少量染劑流失	陽性

【0096】 結果：大部分上述之分離器材料顯示允許嗜剛果紅蛋白質-陽性生物樣本(嗜剛果紅蛋白質陽性尿液)與嗜剛果紅蛋白質-陰性生物樣本(嗜剛果紅蛋白質陰性尿液)的識別。

【0097】 為更進一步改善陰性樣本測試時的檢測試劑(CR)之留存，測試片接著利用表 6 中描述之選擇之分離器材料以三層製成。

[表 6]

分離器材料	陰性樣本的測試結果	陽性樣本的測試結果
EMI 11513	陰性	弱陽性
642	陰性	陽性
C048	陰性	弱陽性
CF1	陰性，少量流失	陽性

【0098】 結果：三層分離器有效地留存未結合之 CR 檢測試劑而不使其進入顯示片。然而，由 EMI 11513 及 C048 製成之三層分離器配置亦降低測試陽性樣本之結果訊號強度。由 642 製成之三層分離器在測試的分離器之中，提供陽性樣本及陰性樣本兩者的最佳結果。

範例 14

分離器材料的進一步探討

【0099】 為更進一步探討使用作為本發明之診斷測試裝置內之分離器的適當材料，測試片由兩個 Porex[®] 樣本墊，其中第一樣本墊以 CR 染劑(8 μl/cm)條紋化；如表 7 所述之分離器；以及 MN260 執行片所組成。各配置之測試片皆以嗜剛果紅陰性尿液樣本、兩個弱陽性嗜剛果紅蛋白樣本及兩個強陽性嗜剛果紅蛋白樣本進行測試。

[表 7]作為單層的分離器材料之探討

材料	陰性	弱陽性	強陽性	弱陽性	強陽性
EMI 11513	-	+-		+-	++
237	-	+	++	+	++
319	-	+	++	+	++
CF1	-	+-	++	+-	+
Vivid™	-	++	++	+-	++
5475	-	+	++	+-	++
5493	-	+-	++	+-	++
C048	-	+-	+	+-	+
CF3	-	+-	+	+-	+
238	-	+	+	+-	+
601	-	+	+	+	+
1281	-	+-	+	+-	++
642	-	+-	+	+-	+
MN640m	-	+-	+	+-	+
MN615	-	+-	++	+-	+

【0100】 意外的，5493 結果較 5475 之結果弱，其中 5493 相較於 5475 具有約 4 倍的吸收性及 2 倍快的毛細上升特性。此結果顯示吸收性低且毛細上升較慢之材料對於穩定化訊號為較佳的。同樣地，CF3 較具有兩倍吸收力的 CF1 弱。材料 238 具有較 237 弱之訊號，且具有兩倍的吸附速度，且 319 在此列表

中呈現最強的顏色結果，其具有最慢的吸附速度。運行較快的材料之 MN640 具有比 MN-615 弱的訊號。

【0101】 結果顯示具有較弱的吸收性、較慢的毛細上升或吸附速度之材料對於更穩定化訊號可為較佳材料。

範例 15

診斷檢測裝置之評估

【0102】 組成完整的測試片，其包含：置於 Fusion 5 (由 GE 生產的專屬單層基質膜)之頂部上的浸有染劑之 Porex[®] 樣本墊、Vivid[™] 膜片分離器以及 MN260 毛細管床膜。該測試片容納於通用 LFA 片匣殼。尿液樣本加入至圓形樣本槽，且於三分鐘時於矩形觀測窗觀察結果。

【0103】 結果：陰性尿液樣本於觀測窗無觀測到染劑，弱陽性尿液樣本觀測到淡粉紅色，強陽性尿液樣本觀測到深粉紅色。上述結果表示此為用於檢測樣本內嗜剛果紅蛋白的診斷測試裝置用以診斷子癇前症的適當配置。

範例 16

最佳化分離器材料的進一步評估

【0104】 組成完整的測試片，其包含：浸有染劑之 Porex[®] 樣本墊，第二 Porex[®] 樣本墊(不含染劑)、11513、5475、319、247 或 CF1 的單層或雙層分離器、具有 Whatman 470 芯片之 MN260 膜毛細管床。MN260 含有酒石黃染劑之執行控制組條紋。該測試片被容納於類似 LFA 片匣，以使測試樣本添加至浸有染劑之 Porex[®] 墊上、以及使觀測窗居中於 MN260 膜上最佳化，以在執行測試

之前可觀察到酒石黃染劑，而執行測試之後觀測不到。尿液樣本加入至圓形樣本槽且結果在三分鐘後可於該矩形觀測窗觀測結果。

結果

【0105】 在三分鐘後，陰性尿液樣本於觀測窗沒有觀測到染劑，弱陽性尿液樣本觀測到淡粉紅色，且強陽性尿液樣本觀測到深粉紅色/紅色。此外，在加入樣本之前明顯之黃色酒石黃染劑條紋可觀察到隨著樣本吸附而移動，且三分鐘後幾乎不可視或完全消失。上述結果表示此為用於檢測樣本內嗜剛果紅蛋白的診斷測試裝置用以診斷子癩前症的適當配置。

範例 17

本裝置之結果與 CRD 測試結果

【0106】 本發明之測試裝置藉由測試自疑似罹患子癩前症婦女的剛果紅點狀(CRD)測試之研究的 105 個臨床尿液樣本進行評估(Rood 等人，2016 AJOG, 214(1)s24-s25)。該樣本進行選擇而提供 27 個強陽性樣本、28 個陰性樣本及 50 個弱陽性樣本。該樣本之陰性/陽性狀態由 %CRR 定義(Irina A. Buhimschi 等人, *Sci. Transl. Med.* 6, 245ra92 (2014))。該樣本皆被加至檢測裝置且結果皆於三分鐘後進行視覺評分：陰性(- 或 0)、弱陽性(+ 或 1)或強陽性(++ 或 2)。

【0107】 結果顯示測試裝置結果與 CRD 結果為 103/105 個(98 %)樣本一致。當與子癩前症的判定診斷(基於 ACOG 準則：Hypertension in Pregnancy Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy, 2013 *Obstetrics & Gynecology* 122(5): 1122-1131))進行

比較時，本發明之裝置之測試結果顯示具有 91% 之靈敏度；64% 之特異性，82% 的準確率，其中陽性預測值為 83% 及陰性預測值為 79%。

【0108】 當測試樣本加入該測試之樣本槽上，於 30 秒後可觀察到液體前端移上測試片。於約 1 分鐘時該前端觸及黃色染劑控制條紋並於約 1.5 分鐘時移至該觀測窗至末端。隨著液體前端移至結果觀測窗的 30 秒及之後可清楚見到強陽性結果。測視窗的完整結果著色約 1.5 分鐘。由於液體前端通常在加入樣本後的約 1 至 3 分鐘以於結果觀測窗顯色而顯示陰性，因此弱陽性結果較強陽性結果需更長的時間進行解析。第 1 圖呈現結果的範例。

範例 18

裝置使用尿液樣本控制組之評估

【0109】 組成的裝置測試片包含：浸有 120ug/裝置染劑的 Porex® 4588 樣本墊、第二 Porex® 樣本墊(不含染劑)、Ahlstrom 319 之雙層分離器、具有 Whatman 470 芯片之 MN260 膜毛細管床。MN260 含有酒石黃染劑之執行控制組條紋。該測試片被容納於類似 LFA 片匣，以使測試樣本添加至浸有染劑之 Porex® 墊上、以及使觀測窗居中於 MN260 膜上最佳化，以在執行測試之前可觀察到酒石黃染劑，而執行測試之後觀測不到。

【0110】 自確認罹患子癇前症的 5 位病患之尿液樣本匯集並建立陽性分析控制組。嗜剛果紅蛋白之存在藉由剛果紅點漬測試 (Buhimschi 2014)進行確認。磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate buffered saline)(10 mM 磷酸鹽(phosphate)，pH 7.4，150 mM NaCl)使用作為陰性控制組且用於系列稀釋陽性分析控制組。製

備以下比例之稀釋溶液(樣本對緩衝液總體積之比例)：未稀釋、1:4、1:8、1:15 及 1:40。各系列稀釋之尿液樣本於裝置中以二重複測試。

【0111】 結果：對於特定稀釋的各尿液樣本之各重複在該裝置上呈現相同染色密度。該測試結果呈現於下表。

[表 8] 匯集尿液樣本之系列稀釋的測試結果

稀釋	測試結果
未稀釋	+++
1:4	++
1:8	+
1:10	±
1:15	±
1:40	-

【0112】 上列數據證實該診斷裝置可檢測嗜剛果紅性蛋白質，且該效應為可滴定的(titratable)。該數據亦表示，該裝置對應於嗜剛果紅性蛋白質的濃度增加而呈現紅色的漸進式視覺量表(progressive visual scale)。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種確定一懷孕哺乳動物是否患有子癰前症或不同妊娠高血壓疾病的方法，包括以下步驟：

a) 將該懷孕哺乳動物的一生物樣本施加至一診斷裝置中，包括：

(i) 一樣本接收材料，其中該樣本接收材料可接收該生物樣本；

(ii) 一檢測試劑，其中該檢測試劑可與存在於該生物樣本中之至少一蛋白質反應；

(iii) 分離器(trap)，其中該分離器與該樣本接收材料接觸，且分離該分離器係將與該生物樣本中的該至少一蛋白質結合之該檢測試劑以及沒有與該生物樣本中的該至少一蛋白質結合之該檢測試劑，其中於該生物樣本中與該至少一蛋白質結合之該檢測試劑係流經該分離器，且因而於該生物樣本中沒有與該至少一蛋白質結合之該檢測試劑係藉由該分離器捕捉；以及

(iv) 一毛細管床，其中該毛細管床與該分離器接觸，且其中該毛細管床配置成在該生物樣本流經該分離器之後含有該生物樣本，其中該樣本接收材料、該分離器以及該毛細管床配置成依序接觸，且若該生物樣本中存在該至少一蛋白質時，則該毛細管床顯示該檢測試劑；以及

(b) 檢測於該毛細管床上結合之該檢測試劑的存在，其中該毛細管床上之該檢測試劑的存在表示該至少一蛋白質存在於該生物樣本中，

當該生物樣本中存在該至少一蛋白質時，表示該懷孕哺乳動物患有該子癰前症且無該不同妊娠高血壓疾病，

當該生物樣本中不存在該至少一蛋白質時，表示該懷孕哺乳動物可能

患有該子癇前症以外之該不同妊娠高血壓疾病。

【請求項2】 如請求項 1 所述的方法，其中該不同妊娠高血壓疾病選自於慢性高血壓、妊娠高血壓和其他原因造成之高血壓。

【請求項3】 如請求項 1 所述的方法，其中該子癇前症選自於輕度子癇前症、重度子癇前症、非典型子癇前症、溶血性肝臟酵素升高低血小板(HELLP)症候群及子癇症。

【請求項4】 如請求項 1 所述的方法，其中該診斷裝置之該樣本接收材料包括該檢測試劑。

【請求項5】 如請求項 1 所述的方法，其中該檢測試劑在該診斷裝置之該樣本接收材料之上或之內。

【請求項6】 如請求項 1 所述的方法，其中在將該懷孕哺乳動物的該生物樣本施加至該診斷裝置中之該樣本接收材料之後，該診斷裝置之該樣本接收材料將該檢測試劑釋放到該生物樣本中。

【請求項7】 如請求項 6 所述的方法，該診斷裝置之該樣本接收材料為用來混合該檢測試劑與該生物樣本之一基質。

【請求項8】 如請求項 7 所述的方法，其中在該檢測試劑與該生物樣本混合之後，該診斷裝置之該樣本接收材料將混合的該檢測試劑與該生物樣本釋放至與該診斷裝置之該樣本接收材料相鄰之該診斷裝置之毛細管床。

【請求項9】 如請求項 1 所述的方法，其中該檢測試劑與該至少一蛋白質結合，該至少一蛋白質選自於一折疊錯誤蛋白質、一蛋白質聚集體、一超分子蛋白質聚集體、前述各蛋白質之一混合物、該折疊錯誤蛋白質的不同斷片、該蛋白質聚集體的不同斷片、該超分子蛋白質聚集體的不同斷

片以及前述各斷片之一混合物。

【請求項10】 如請求項 9 所述的方法，其中該折疊錯誤蛋白質選自於 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 (Serpina1)、血漿銅藍蛋白、重鏈 IgG、輕鏈 IgG、可誘導干擾素蛋白質 6-16 (IF-16-6, G1P3)、白蛋白以及前述各蛋白質的斷片。

【請求項11】 如請求項 1 所述的方法，其中該至少一蛋白質為嗜剛果紅性(congophilic)。

【請求項12】 如請求項 1 所述的方法，其中該檢測試劑選自於偶氮染劑、硫代黃素 T 以及該偶氮染劑之相似物。

【請求項13】 如請求項 12 所述的方法，其中該偶氮染劑為剛果紅。

【請求項14】 如請求項 13 所述的方法，其中該剛果紅被預載至該診斷裝置之該樣本接收材料上。

【請求項15】 如請求項 1 所述的方法，其中該生物樣本選自於尿液、血液、唾液、組織、組織液、血清、血漿、腦脊髓液、羊水以及萃取物質。

【請求項16】 如請求項 1 所述的方法，其中該懷孕哺乳動物選自於人類、靈長類以及基因工程哺乳動物所組成的群組。

【請求項17】 如請求項 1 所述的方法，其中該至少一蛋白質係通過可視化而被檢測出來。

【請求項18】 如請求項 17 所述的方法，其中該至少一蛋白質的存在是通過該檢測試劑之可視化檢測而確定。

【請求項19】 如請求項 18 所述的方法，其中該可視化是經由人類或機械手段而實現的。

【請求項20】 如請求項 19 所述的方法，更包括：

(c) 測量該至少一蛋白質。

【請求項21】 如請求項 1 所述的方法，其中該檢測試劑的濃度對應於該至少一蛋白質的量。

【請求項22】 如請求項 21 所述的方法，其中該檢測試劑的濃度由一電子讀取器確定。

【請求項23】 如請求項 1 所述的方法，其中該檢測試劑沿著該毛細管床向上流經的距離指示該生物樣本中該至少一蛋白質的量。

【請求項24】 如請求項 1 所述的方法，其中該檢測試劑之濃度的強度和該檢測試劑沿著該毛細管床向上流經的距離指示該生物樣本中該至少一蛋白質的量。

【請求項25】 如請求項 1 所述的方法，其係用來與另一診斷化驗組合使用，其中該診斷分析用來偵測子癩前症之至少一生物標記物。

【請求項26】 如請求項 25 所述的方法，其中該另一診斷化驗為一免疫分析法。

【請求項27】 如請求項 26 所述的方法，其中該免疫分析選自於酵素免疫分析法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)和螢光免疫分析法(FIA)所組成的群組。

【請求項28】 如請求項 25 所述的方法，其中該子癩前症之至少一生物標記物選自於 *fms* 樣酪氨酸激酶-1 (*ms-like tyrosine kinase-1*, *sFlt-1*)、胎盤生長因子 (PlGF)、妊娠相關蛋白-A (PP-A)、胎盤蛋白 13 (PP13)、正五聚蛋白、抑制素-A 和可溶之內皮因子。

【請求項29】 如請求項 1 所述的方法，其中該診斷裝置包括一校

準器或一控制組試劑。

【請求項30】 如請求項 1 所述的方法，其中該診斷裝置包括一芯片(wick)。

【請求項31】 一種診斷測試片，用於檢測哺乳動物生物樣本中至少一種蛋白質，該診斷測試片包括：

- a) 至少一樣本接收材料，其中該樣本接收材料能夠接收一生物樣本；
- b) 至少一分離器，其中該陷阱能夠將與該生物樣本中的至少一蛋白質結合的檢測試劑與未與該生物樣本中的該至少一蛋白質結合的檢測試劑分離開來；以及
- c) 一顯示片。

【請求項32】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該至少一樣本接收材料、該至少一分離器以及該顯示片依序接觸。

【請求項33】 如請求項 32 所述的診斷測試片，其中該至少一樣本接收材料緊貼在該至少一分離器上，且該至少一分離器緊貼在該顯示片上。

【請求項34】 如請求項 32 所述的診斷測試片，其中該至少一樣本接收材料與該至少一分離器重疊，而該至少一分離器與該顯示片重疊。

【請求項35】 如請求項 34 所述的診斷測試片，其中該至少一樣本接收材料包括第一樣本接收材料和第二樣本接收材料。

【請求項36】 如請求項 34 所述的診斷測試片，其中該至少一分離器包括第一分離器和第二分離器。

【請求項37】 如請求項 36 所述的診斷測試片，其中該至少一樣本接收材料與該第一分離器重疊，該第一分離器與該第二分離器重疊，而該

第二分離器與該顯示片重疊。

【請求項38】 如請求項 32 所述的診斷測試片，其中該至少一分離器包括第一分離器、第二分離器和第三分離器。

【請求項39】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該測試片進一步包括一控制組試劑。

【請求項40】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該至少一樣本接收材料包括選自於由硝化纖維素(nitrocellulose)、纖維素(cellulose)、玻璃纖維、棉花、編織篩網、不織布材料、多孔性塑膠、聚合物及聚酯類(polyester)所組成的群組中之一材料。

【請求項41】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該至少一分離器包括選自於由硝化纖維素、纖維素、玻璃纖維、棉花/玻璃纖維、編織篩網、不織布材料、聚合物及聚砜類(polysulfone)所組成的群組中之一材料。

【請求項42】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該顯示片包括選自於由硝化纖維、層析紙、聚砜類及纖維素所組成的群組中之一材料。

【請求項43】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該至少一蛋白質選自於一折疊錯誤蛋白質、一蛋白質聚集體、一超分子蛋白質聚集體、該折疊錯誤蛋白質的一斷片、該蛋白質聚集體的一斷片、該超分子蛋白質聚集體的一斷片以及前述之混合物。

【請求項44】 如請求項 43 所述的診斷測試片，其中該折疊錯誤蛋白質選自於 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 (Serpina1)、血漿銅藍蛋白、重鏈 IgG、輕鏈 IgG、可誘導干擾素蛋白質 6-16 (IF-16-6, G1P3)、白蛋白以及前述各蛋白質的斷片。

【請求項45】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該至少一蛋白

質為嗜剛果紅性。

【請求項46】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該分離器允許與該生物樣本中該至少一蛋白質結合之一檢測試劑流經該分離器。

【請求項47】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該分離器留存、阻礙未結合的檢測試劑的流動或與未結合的檢測試劑結合。

【請求項48】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中該顯示片設計成可在該生物樣本通過該分離器後容納該生物樣本。

【請求項49】 如請求項 31 所述的診斷測試片，其中若該至少一蛋白質存在於該生物樣本中，則該顯示片會顯示該檢測試劑。

【請求項50】 一種封裝一裝置的外殼或片匣，其中該裝置包括如請求項 31 所述的診斷測試片。

【請求項51】 如請求項 50 所述的外殼或片匣，其中該外殼或片匣更包括用於施用該生物樣本之一槽。

【請求項52】 如請求項 50 所述的外殼或片匣，其中該外殼或片匣更包括用於讀取所獲取的結果之窗口。

【請求項53】 一種包括一裝置的套件，其中該裝置包括如請求項 31 所述的診斷測試片。

【請求項54】 如請求項 53 所述的套件，更包括一使用說明書。

【請求項55】 如請求項 53 所述的套件，更包括一樣本施用器。

【請求項56】 如請求項 53 所述的套件，更包括一校準器或一控制組試劑。

【請求項57】 如請求項 53 所述的套件，更包括該檢測試劑。

【請求項58】 如請求項 57 所述的套件，其中該檢測試劑選自於偶

氮染劑、硫代黃素 T 以及該偶氮染劑之相似物所組成的群組。

【請求項59】 如請求項 58 所述的套件，其中該偶氮染劑為剛果紅。

【請求項60】 一種套件，用於檢測哺乳動物之一生物樣本中至少一蛋白質，該套件包括：

a) 一樣本接收材料，其中該樣本接收材料能夠接收該生物樣本；

b) 一分離器，其中該分離器與該樣本接收材料接觸，且分離該分離器係將與該生物樣本中的該至少一蛋白質結合之該檢測試劑以及沒有與該生物樣本中的該至少一蛋白質結合之該檢測試劑，其中於該生物樣本中與該至少一蛋白質結合之該檢測試劑係流經該分離器，且因而於該生物樣本中沒有與該至少一蛋白質結合之該檢測試劑係藉由該分離器捕捉；

c) 一顯示片，其中該顯示片與該分離器接觸，並且該顯示片被配置成在該生物樣本流經該分離器後容納該生物樣本，其中該樣本接收材料、該分離器和該顯示片依序接觸；以及

d) 一檢測試劑，其中該檢測試劑與該生物樣本中的該至少一蛋白質具有反應性。

【請求項61】 如請求項 60 所述的套件，其中若該生物樣本中含有該至少一蛋白質，該顯示片會顯現出該檢測試劑。

【請求項62】 如請求項 60 所述的套件，其中該檢測試劑與該至少一蛋白質結合，該至少一蛋白質選自於一折疊錯誤蛋白質、一蛋白質聚集體、一超分子蛋白質聚集體、該折疊錯誤蛋白質的不同斷片、該蛋白質聚集體的不同斷片、該超分子蛋白質聚集體的不同斷片以及前述各者之一混合物所組成的群組。

【請求項63】 如請求項 60 所述的套件，其中該檢測試劑選自於偶

氮染劑、硫代黃素 T 以及該偶氮染劑之相似物所組成的群組。

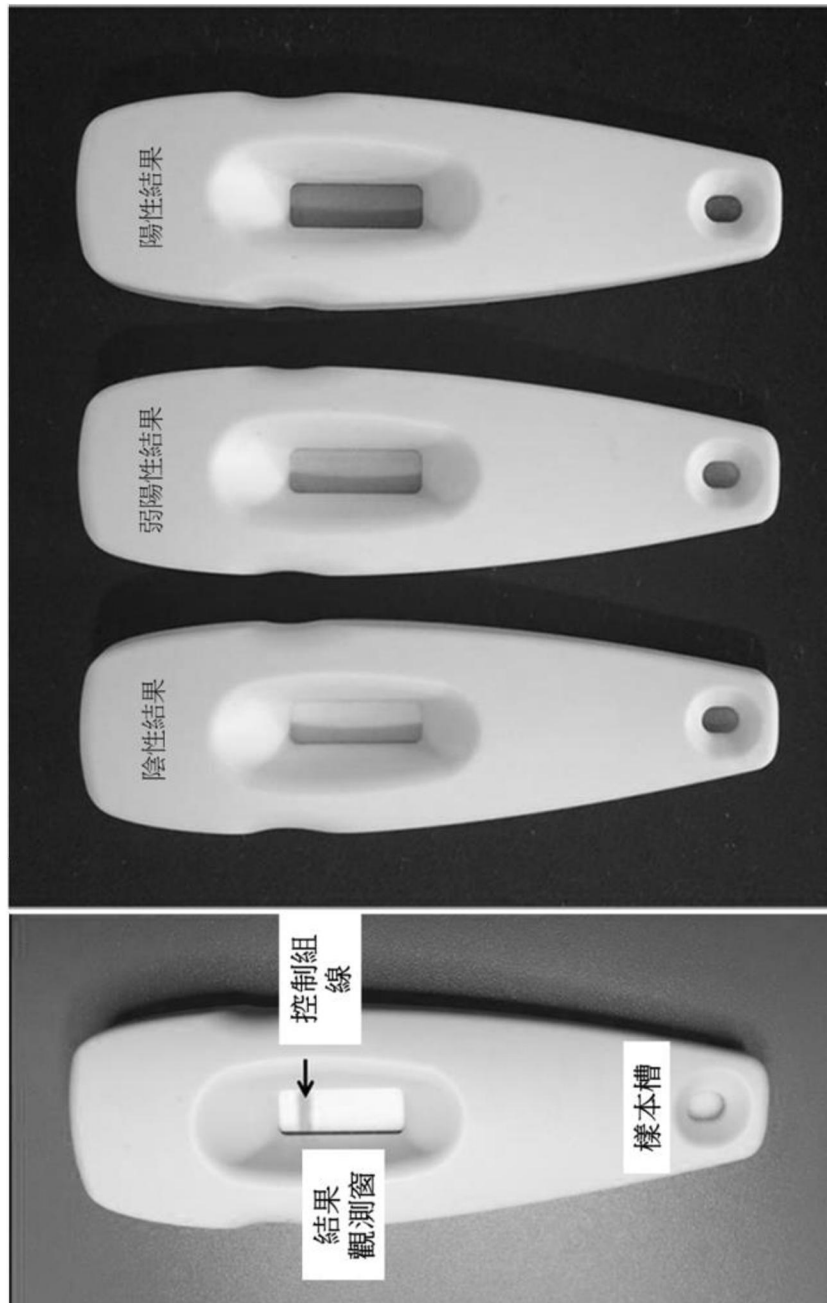
【請求項64】 如請求項 61 所述的套件，其中該偶氮染劑為剛果紅。

【請求項65】 如請求項 60 所述的套件，更包括一使用說明書。

【請求項66】 如請求項 60 所述的套件，更包括一樣本施用器。

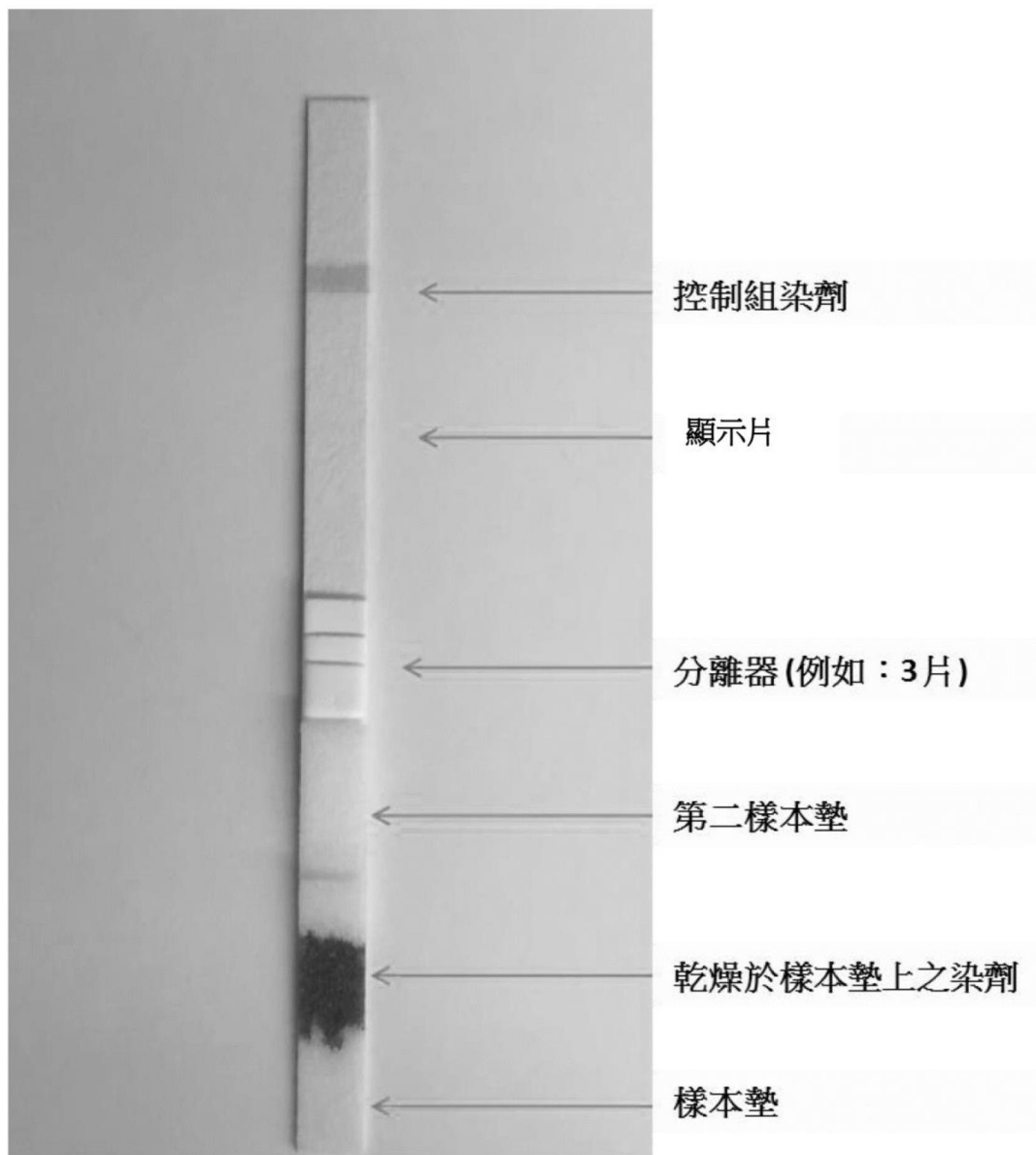
【請求項67】 如請求項 60 所述的套件，更包括一校準器或一控制組試劑。

【發明圖式】



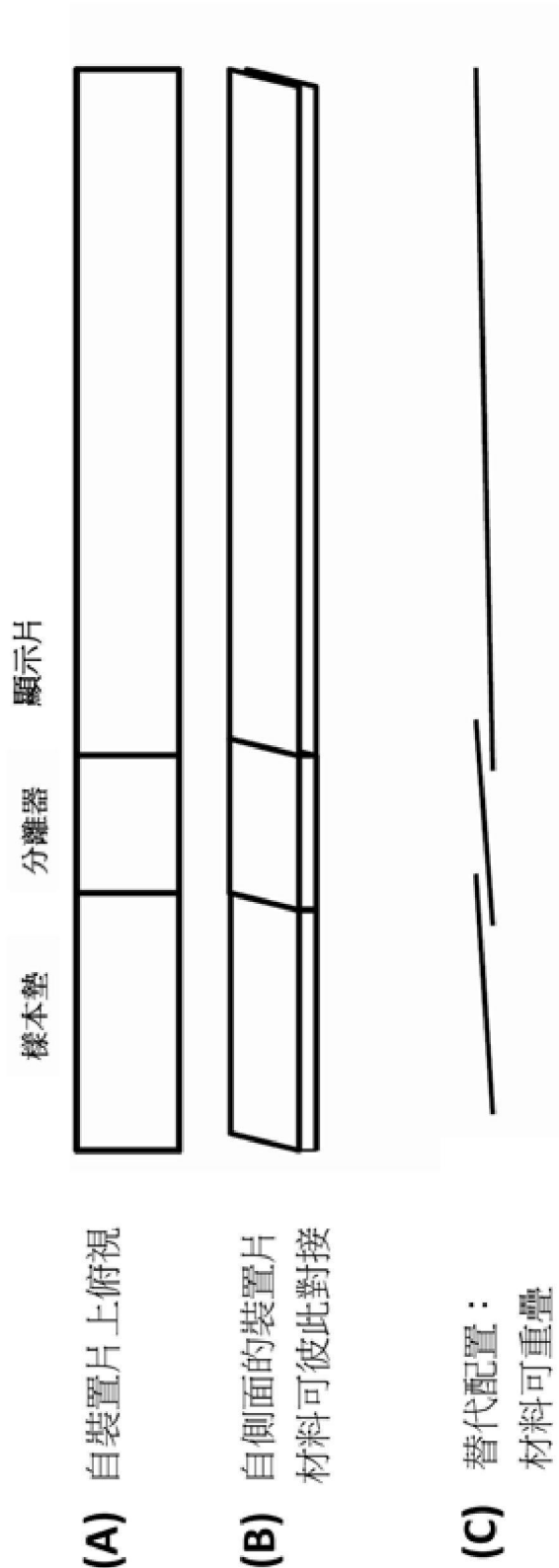
【第 1 圖】

測試芯片之範例



【第 2 圖】

測試片之構件



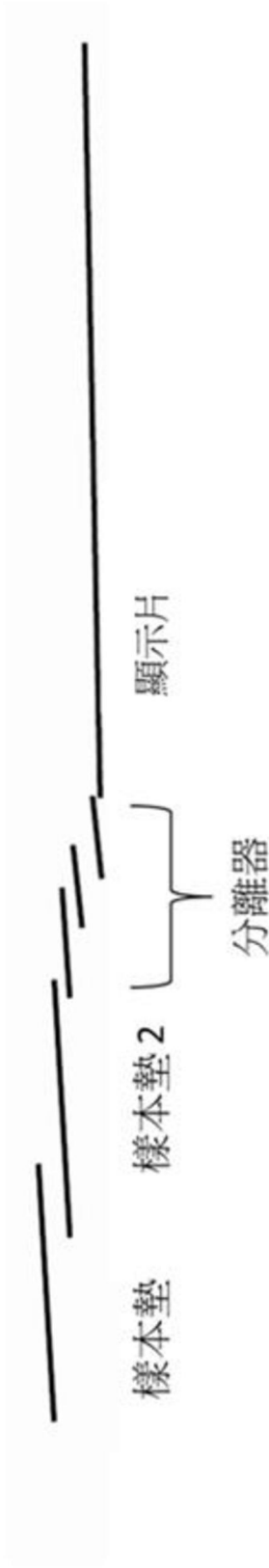
【第 3 圖】

測試片中之分離器配置

(A)



(B)



【第 4 圖】

測桿配置之範例



【第 5 圖】