



(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 I872060 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：109112218

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 10 日

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

G01N33/558 (2006.01)

G01N33/573 (2006.01)

(30)優先權：2019/04/12 美國

62/833,235

2019/11/05 美國

62/930,615

(71)申請人：日商武田藥品工業股份有限公司(日本) TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (JP)

日本

(72)發明人：喬卡琳姆 普利亞 瑟蘇 CHOCKALINGAM, PRIYA SETHU (US) ; 周 季維 ZHOU, ZHIWEI (US)

(74)代理人：楊長峯

(56)參考文獻：

WO 2014/113701A1

期刊 Si, Jinhong et al. A signal amplification system on a lateral flow immunoassay detecting for hepatitis e-antigen in human blood samples. Journal of medical virology vol. 91 Epub 2019 Mar 18 1301-1306

審查人員：陳婷妤

申請專利範圍項數：55 項 圖式數：17 共 67 頁

(54)名稱

用於測量血漿樣本中的功能性 C1-酯酶抑制子(C1-INH)的側流免疫分析

(57)摘要

一種用於偵測及/或定量功能性 C1-酯酶抑制子 (fC1-INH) 之裝置，該裝置包含：(i) 共軛物墊，其包含第一區域及第二區域，第一試劑及第二試劑分別固定於該第一區域及該第二區域上；及(ii) 膜，其與該共軛物墊連通，其中該膜包含第三區域，第三試劑固定於該第三區域上。該共軛物墊可進一步包含用於置放生物樣本之第四區域，該生物樣本按該第一區域、該第二區域、及該第三區域之次序流動穿過該裝置。

A device for detecting and/or quantifying functional C1-esterase inhibitor (fC1-INH), the device comprising: (i) a conjugate pad comprising a first zone and a second zone, on which a first agent and a second agent are immobilized, respectively, and (ii) a membrane, which is in communication with the conjugate pad, wherein the membrane comprises a third zone, on which a third agent is immobilized. The conjugate pad may further comprise a fourth zone for placing a biological sample, which flows through the device in the order of the first zone, the second zone, and the third zone.

指定代表圖：

符號簡單說明：

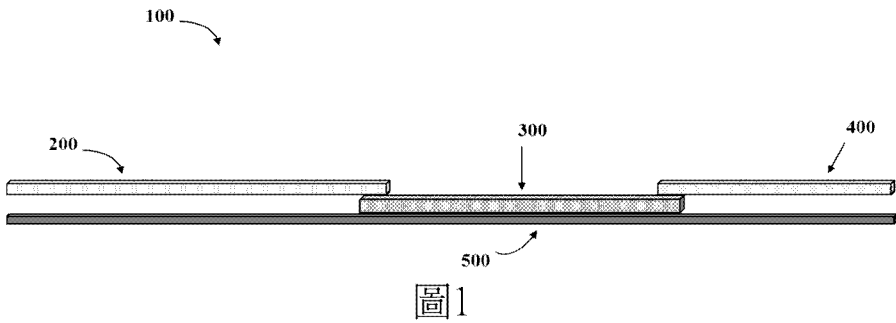
100:LFA 裝置

200:共軛物墊

300:膜

400:吸收墊

500:支撐構件





I872060

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於測量血漿樣本中的功能性C1-酯酶抑制子(C1-INH)的側流免疫分析

【英文發明名稱】 LATERAL FLOW IMMUNOASSAY FOR MEASURING FUNCTIONAL C1-ESTERASE INHIBITOR (C1-INH) IN PLASMA SAMPLES

【中文】

一種用於偵測及/或定量功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之裝置，該裝置包含：(i) 共軛物墊，其包含第一區域及第二區域，第一試劑及第二試劑分別固定於該第一區域及該第二區域上；及 (ii) 膜，其與該共軛物墊連通，其中該膜包含第三區域，第三試劑固定於該第三區域上。該共軛物墊可進一步包含用於置放生物樣本之第四區域，該生物樣本按該第一區域、該第二區域、及該第三區域之次序流動穿過該裝置。

【英文】

A device for detecting and/or quantifying functional C1-esterase inhibitor (fC1-INH), the device comprising: (i) a conjugate pad comprising a first zone and a second zone, on which a first agent and a second agent are immobilized, respectively, and (ii) a membrane, which is in communication with the conjugate pad, wherein the membrane comprises a third zone, on which a third agent is immobilized. The conjugate pad may further comprise a fourth zone for placing a biological sample, which flows through the device in the order of the first zone, the second zone, and the third zone.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

100: LFA裝置

200: 共軛物墊

300: 膜

400: 吸收墊

500: 支撐構件

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於測量血漿樣本中的功能性C1-酯酶抑制子(C1-INH)的側流免疫分析

【英文發明名稱】 LATERAL FLOW IMMUNOASSAY FOR MEASURING FUNCTIONAL C1-ESTERASE INHIBITOR (C1-INH) IN PLASMA SAMPLES

【技術領域】

【0001】 本申請案係關於用於偵測及/或定量功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之裝置及用於偵測及/或定量樣本中之功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之方法。

相關申請案

【0002】 本申請案根據35 U.S.C. § 119 (e) 主張2019年4月12日申請之美國臨時申請案第62/833,235號及2019年11月5日申請之美國臨時申請案第62/930,615號之權益，該等申請案之全部內容以引用之方式併入本文中。

【先前技術】

【0003】 C1-酯酶抑制子（亦稱為C1-抑制子或C1-INH）為屬於絲胺酸蛋白酶抑制子（serpin）超家族之蛋白酶抑制子。其主要功能為抑制補體系統以防止自發活化。C1-INH亦為血漿激肽釋放素（pKal）之內源性抑制子。C1-INH中之常染色體顯性突變導致遺傳性血管性水腫（HAE），包括I型及II型HAE。

【0004】 用於評定C1-INH功能性量之當前可用的分析利用顯色分析或複合ELISA方法，測量補體級聯之C1s藉由C1-INH之抑制。顯色分析一般視為較佳

的，但兩種方法皆具有侷限性。顯色分析更可能具有偶發性假陽性，而複合ELISA具有僅62%之陰性預測值。

【0005】 備受關注者為開發用於測量HAE疾病病理學中所涉及之功能性C1-INH的較新分析及/或平台。

【發明內容】

【0006】 本文提供用於以快速且具成本效益的定性及/或定量方式偵測功能性C1-INH（fC1-INH）之裝置及方法。在一些實施方式中，偵測fC1-INH係使用經裝配以經由側流免疫分析（LFA）偵測及/或定量fC1-INH之裝置來達成。

【0007】 因此，本文之揭示內容之一個方面提供一種用於偵測及/或定量功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之裝置，該裝置包含（i）共軛物墊，其包含第一區域及第二區域，第一試劑及第二試劑分別固定於該第一區域及該第二區域上；及（ii）膜，其與該共軛物墊連通，其中該膜包含第三區域，第三試劑固定於該第三區域上。該第一試劑可為功能性C1抑制子（fC1-INH）結合劑或C1抑制子（C1-INH）結合劑。該第二試劑及該第三試劑為功能性C1抑制子（fC1-INH）結合劑、C1抑制子（C1-INH）結合劑、及捕捉劑中之一者。該第一試劑、該第二試劑、及該第三試劑彼此不同。該fC1-INH結合劑、該C1-INH結合劑、及該捕捉劑中之一者與可偵測標記共軛，且該fC1-INH結合劑及該C1-INH結合劑中之一者與銜接劑（docking agent）共軛。該可偵測標記及該銜接劑與不同試劑共軛。該共軛物墊進一步包含用於置放生物樣本之第四區域，該生物樣本按該第一區域、該第二區域、及該第三區域之次序流動穿過該裝置。在一些情況下，用於置放生物樣本之該第四區域可與該第二區域重疊，該fC1-INH結合劑可位於該第二區域上。

【0008】 在一些實施方式中，該第一試劑、該第二試劑、及該第三試劑分

別為該C1-INH結合劑、該fC1-INH結合劑、及該捕捉劑。在其他實施方式中，該第一試劑、該第二試劑、及該第三試劑分別為該fC1-INH結合劑、該C1-INH結合劑、及該捕捉劑。

【0009】 在一些實例中，該第一試劑與該可偵測標記共軛，該第二試劑與該銜接劑共軛。在其他實例中，該第一試劑與該銜接劑共軛，該第二試劑與該可偵測標記共軛。

【0010】 在一些實施方式中，該fC1-INH結合劑可為因子XII之活性形式（FXIIa）。替代地或另外，該C1-INH結合劑可為結合C1-INH之抗體。此外，該銜接劑及該捕捉劑可為受體-配位體對之成員。舉例而言，該受體-配位體對可包含生物素及抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白（streptavidin）或聚鏈黴抗生物素蛋白）。

【0011】 在一些實施方式中，該可偵測標記可為鎘、膠體金、藻紅素、螢光素、玫瑰紅、綠色螢光蛋白、量子點、及發色團。在一些實施方式中，該可偵測標記為鎘。在一些情況下，該可偵測標記可連接至乳膠粒子。

【0012】 在一個實例中，該第一試劑為位於該第一區域之該C1-INH結合劑，該第二試劑為位於該第二區域之該fC1-INH結合劑，且該第三試劑為位於該第三區域之該捕捉劑。該C1-INH結合劑可為結合至C1-INH之抗體，其可與如本文所揭示之可偵測標記共軛。替代地或另外，該fC1-INH結合劑可為FXIIa，其可與銜接劑（例如生物素）共軛。此外，該捕捉劑可為抗生物素蛋白，諸如鏈黴抗生物素蛋白或聚鏈黴抗生物素蛋白。

【0013】 在一些實施方式中，該裝置進一步包含與該膜連通之吸收墊。該吸收墊及該共軛物墊可藉由該膜分隔開。替代地或另外，該裝置可進一步包含支撐構件，該共軛物墊、該膜、及/或該吸收墊安裝在該支撐構件上。

【0014】 此外，該裝置亦可包含外殼。在一些實施方式中，該外殼可包含

形成緩衝液口之第一開口、形成取樣口之第二開口、及形成測試窗口之第三開口。該取樣口可位於該緩衝液口與該測試窗口之間。在一些實例中，該緩衝液口可與該第一區域對準，該C1-INH結合劑位於該第一區域上。在一些實例中，該取樣口可與該第二區域對準，該fC1-INH結合劑位於該第二區域上。在一些實例中，該測試窗口與該第三區域對準，該捕捉劑位於該第三區域上。

【0015】 在另一方面中，本文之揭示內容提供使用本文所揭示之LFA裝置中之任一者偵測及/或定量樣本中之功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）的方法。如此方法可包含：(i) 將樣本置放於本文所描述之裝置之該取樣口中，(ii) 將緩衝液置放於該裝置中的該緩衝液口中，其中該緩衝液以該第一區域往該第三區域的方向流動；(iii) 檢查該裝置中之該測試窗口處的信號，及(iv) 基於該測試窗口處的信號之存在或強度測定該樣本中fC1-INH之存在或測量該樣本中fC1-INH之量。在一些實施方式中，步驟(ii)在步驟(i)之後至少至少5分鐘之後進行。該fC1-INH結合劑可固定在該第二區域，該第二區域可與該取樣口對準。

【0016】 本文亦提供用於偵測及/或定量樣本中之功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）的方法，該方法包含使樣本與fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑、及捕捉劑接觸以形成複合物，其中該fC1-INH結合劑及該C1-INH試劑中之一者與結合該捕捉劑之銜接劑共軛，且其中該fC1-INH結合劑、該C1-INH試劑、及該捕捉劑中之一者與可偵測標記共軛，該可偵測標記及該銜接劑與不同試劑共軛；及偵測自該複合物中之該可偵測標記釋放之信號；其中自該複合物中之該可偵測標記釋放之信號的存在指示樣本中之fC1-INH的存在。如本文所揭示之該fC1-INH結合劑、該C1-INH結合劑、該銜接劑、該可偵測標記、及該捕捉劑中之任一者均可用於本文所揭示之方法中。

【0017】 在一些實施方式中，步驟(i)可藉由以下者進行：(a) 將該樣

本與該fC1-INH結合劑一起培育至少5分鐘，及(b)使該樣本與該C1-INH結合劑及該捕捉劑接觸。在其他實施方式中，步驟(i)藉由以下者進行：(a)用該fC1-INH結合劑培育樣本至少5分鐘以形成第一複合物，(b)使該第一複合物與該C1-INH結合劑接觸以形成第二複合物，及(c)使該第二複合物與該捕捉劑接觸以形成該複合物，且其中該捕捉劑固定於支撐構件上。

【0018】 在本文所揭示之分析方法中之任一者中，待分析之樣本可為獲自個體之生物樣本，例如血清樣本、血漿樣本、或血液樣本（例如全血）。在一些實施方式中，該個體可為疑似患有fC1-INH缺乏介導之病症或處於該病症風險下的人類患者，該病症包括但不限於遺傳性血管性水腫（HAE）、獲得性血管性水腫（AAE）、及C1-INH相關免疫疾病。在一些實施方式中，該個體具有HAE症狀。在一些實施方式中，該HAE為I型HAE或II型HAE。在其他實施方式中，該個體不具有HAE之症狀、不具有HAE之症狀之病史、或不具有HAE之病史。在一些實施方式中，該個體對抗組織胺療法、皮質類固醇療法、或兩者具有抗性。

【0019】 本文所描述之裝置及方法之若干實施方式的細節闡述於附圖式及以下實施方式中。本文所描述之裝置及方法之其他特徵、目標、及優點基於以下實施方式及自申請專利範圍會是顯而易見的。

【圖式簡單說明】

【0020】

將參考以下圖式描述各種方面及實施方式。該等圖式未必按比例繪製。

[圖1]為用於偵測及/或定量功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之例示性側流分析（LFA）裝置100之示意性描繪。根據本文所描述技術之一些實施方式，LFA裝置100包含共軛物墊200、膜300、及視情況存在之吸收墊400、及支撐構件500。

[圖2]為例示性LFA裝置100之示意性描繪，根據本文所描述技術之一些實施

方式，其顯示各組件之例示性尺寸及兩個相鄰組件之間的例示性重疊尺寸。

[圖3A]為用於偵測及/或定量fC1-INH之例示性LFA裝置**100**之俯視圖的示意性描繪。根據本文所描述技術之一些實施方式，LFA裝置**100**包含共軛物墊**200**，其包含第一區域**210**及第二區域**220**；以及膜**300**，其包含第三區域**230**。

[圖3B]為用於偵測及/或定量fC1-INH之例示性LFA裝置**100**之俯視圖的示意性描繪。根據本文所描述技術之一些實施方式，LFA裝置**100**包含共軛物墊**200**，其包含與用於置放樣本之第五區域**250**重疊之第一區域**210**及與用於置放緩衝液之第四區域**240**重疊之第二區域**220**，以及包含第三區域**230**之膜**300**。

[圖4]為用於偵測及/或定量fC1-INH之例示性LFA裝置**100**之俯視圖的示意性描繪。根據本文所描述技術之一些實施方式，LFA裝置**100**進一步包含外殼**600**，其形成有緩衝液口**610**、取樣口**620**及測試窗口**630**。亦指示第一區域**210**、第二區域**220**、第三區域**230**、共軛物墊**200**、膜**300**、及吸收墊**400**。

[圖5]為根據本文所描述技術之一些實施方式的例示性LFA裝置之影像。

[圖6]圖示使用本文所揭示之LFA裝置，自稀釋入C1-INH耗竭之血漿中之功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）產生之校準曲線。

[圖7]為使用本文所揭示之LFA裝置，基於來自對照個體及患有遺傳性血管性水腫（HAE）之個體之樣本的診斷效能之接收者操作曲線（ROC）圖。

[圖8]圖示使用顯色分析（Chrom）或本文所描述之LFA裝置（LFA）之正常個體（正常（Normal））及患有遺傳性血管性水腫（HAE）之個體中之功能性C1-INH之量。

[圖9]圖示如藉由顯色分析所測定與本文所描述之LFA裝置所測定之患有遺傳性血管性水腫（HAE）之個體中之功能性C1-INH之量之間的相關性。

[圖10A]為顯示使用取樣環及手指針刺收集血液樣本的示意圖。

[圖10B]為顯示將圖10A之填充有血液的取樣環添加至SampleTainer®瓶中之

示意圖。

[圖11A]為顯示在指定條件下使用與鎔奈米粒子共軛之抗C1-INH Fab的圖。

[圖11B]為顯示在指定條件下使用與紅色金奈米粒子共軛之抗C1-INH Fab的圖。

[圖12]為顯示來自在測試線中作為捕捉劑之聚鏈黴抗生物素蛋白R相比於鏈黴抗生物素蛋白之結果的圖。 R^2 值指示與模型線（點線）之擬合。

[圖13]為顯示來自在測試線中使用指定試劑作為捕捉劑之結果的圖。

[圖14]為顯示來自指示抗C1-INH Fab或抗體殖株作為偵測劑之結果的圖。對於各抗體，條柱係指偵測劑之濃度，自左至右，1200 mU/mL，600 mU/mL，100 mU/mL，0 mU/mL。

[圖15]為顯示在不同pH下使用含有無機阻斷劑（IBA）或有機阻斷劑（OBA）之緩衝液之結果的圖。

[圖16]為顯示使用鏈黴抗生物素蛋白測試線（0.75 mg/mL鏈黴抗生物素蛋白）及指定濃度之C1-INH/CINRYZE®之結果的圖。

[圖17]為本文所描述之例示性方法之示意圖。捕捉蛋白（諸如鏈黴抗生物素蛋白）與其對（例如生物素）相互作用，該對與捕捉劑共軛（例如經生物素化之FXIIa），該捕捉劑結合至功能性C1INH（fC1-INH，CINRYZE®）。使用偵測劑，諸如與金粒子共軛之抗C1-INH抗體（抗C1-INH Au共軛物）來偵測結合之fC1-INH。

【實施方式】

【0021】 本文之揭示內容至少部分基於用於測量功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之側流分析（LFA）方法及裝置之發展。LFA方法及裝置經設計用於特異性偵測fC1-INH（例如於生物樣本中）之存在及/或測量fC1-INH之量。

fC1-INH之存在及/或量通常指示與C1-INH起作用之生物路徑相關之疾病的狀態。因此，LFA方法及裝置將特別適用於診斷及預後由C1-INH缺乏介導之疾病，例如由血漿激肽釋放素路徑介導之疾病（例如，諸如遺傳性血管性水腫之疾病），此係因為fC1-INH為pKal路徑之抑制子。

【0022】 如本文所用，「功能性C1-INH」或「fC1-INH」係指呈能夠結合至蛋白因子之形式的C1-INH蛋白，實質上C1-INH結合且發揮其生物活性。如此蛋白因子包括但不限於C1s、因子XIIa(FXIIa)及血漿激肽釋放素(pKal)。fC1-INH之此亞群之偵測尤其有助於評定諸如HAE之疾病中之C1-INH的功能性量。

【0023】 HAE為極罕見且潛在地危及生命之遺傳病況，約10,000人中有1人至50,000人中有1人出現此病況。症狀包括身體之各個部位，包括手、足、面部及呼吸道（咽喉）中之水腫（腫脹）。患者常常遭受由腸道壁中之腫脹造成之極度腹痛、噁心及嘔吐。呼吸道或咽喉之腫脹特別危險；其可由窒息而導致死亡。證實I型及II型HAE所需之三個特定血液測試為C1INH抗原、fC1INH及C4。許多診斷分析使用過時技術且並不快速或標準化或可為全世界可用的。

【0024】 本文揭示之快速且靈敏的LFA方法及裝置可在醫師的辦公室實驗室中進行以便基於fC1INH量快速診斷HAE（例如I型及II型）。如此方法及裝置將引起由健康保險報銷之消耗品的成本低、定量結果中之可信度的程度高、醫師解釋資料容易及/或用於確認分析之需要程度低。在醫師的辦公室中診斷I型或II型HAE之如此快速分析可擴大HAE之篩檢且更快速地鑑別出新的HAE患者。目前，HAE之全球診斷率僅僅為40%；因此，未經診斷之患者具有高度未滿足之需求。常見裝置平台上之快速測試可用性可擴大HAE之辨識。另外，本文所揭示之fC1INH之快速測試可以及時方式在臨床配置中有助於監測HAE疾病進展或對療法之反應。

【0025】 本文所揭示之LFA方法及裝置涉及特異性針對fC1-INH之第一結

合劑 (fC1-INH結合劑)、特異性針對C1-INH (特異性針對功能性C1-INH、非功能性C1-INH或兩者) 之第二結合劑及捕捉劑。fC1-INH結合劑或C1-INH結合劑可與能夠結合至捕捉劑之銜接劑共軛。fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑中之一者可與可偵測標記共軛。因此, 樣本 (例如生物樣本) 中之fC1-INH可與fC1-INH結合劑及C1-INH結合劑形成複合物。如此複合物可經由捕捉劑與銜接劑 (其與C1-INH結合劑及fC1-INH結合劑中之一者共軛) 之間的相互作用結合至捕捉劑。在偵測到自可偵測標記釋放之信號 (例如存在或強度) 後, 樣本中fC1-INH之存在或量可基於連同的所測試標準測定及/或定量。舉例而言, 以不同量之Cinryze[®], 經純化之人類血漿衍生之C1INH可用作標準物, 以產生標準曲線, 從而推知及測定樣本中fC1INH之量, 如藉由本文所揭示之方法中之任一者所測量。自可偵測標記釋放之信號之強度可基於標準定量為樣本中fC1INH的U/ml, 且指示樣本中fC1-INH之量。

I. 用於側流分析 (LFA) 中之組分

【0026】 本文所揭示之LFA方法及裝置涉及 (i) fC1-INH結合劑, (ii) C1-INH結合劑, 其中之一者與銜接劑共軛, 及 (iii) 捕捉劑, 其結合該銜接劑。 (i) - (iii) 中之一者與可偵測標記共軛。

(a) fC1-INH結合劑

【0027】 fC1-INH結合劑為特異性結合功能性C1-INH之分子 (例如結合fC1-INH之蛋白或其片段)。若分子與特定標靶 (例如本文所揭示之彼等) 之反應比其與替代性標靶 (其可為特定標靶之變化形式) 之反應更頻繁、更快速、持續時間更長及/或親和力更大, 則稱其展現「特異性結合」。舉例而言, 與諸如非功能性C1-INH之替代性標靶相比, 特異性結合fC1-INH的分子之反應將更頻

繁、更快速、持續時間更長及/或對fC1-INH的親和力更大。「特異性結合」或「優先結合」未必需要（儘管其可包括）獨佔式結合。

【0028】 在一些情況下，能夠實質上結合至fC1-INH之蛋白或多肽或其結合片段可用作fC1-INH結合劑。在一些實例中，fC1-INH結合劑為FXII，例如，FXII之活性形式（FXIIa）。因子XII為參與血液凝固、纖維蛋白溶解之起始以及緩激肽及血管收縮素之產生的血清糖蛋白。前激肽釋放素藉由因子XII裂解以形成激肽釋放素，其接著活化因子XII，導致形成因子XIIa及因子XII片段（因子XII_f）（「*Histidine-rich glycoprotein binds factor XIIa with high affinity and inhibits contact-initiated coagulation*」 Macquarrie, 等人, *Blood* **117**:4134-4141 2011）。已顯示出C1抑制子（C1-INH）為因子XIIa與因子XII_f之重要血漿抑制子（「*Effect of negatively charged activating compounds on inactivation of factor XIIa by C1 inhibitor*」 Pixley, 等人, *Arch Biochem Biophys* **256**（2）:490-8 1987）。

【0029】 包括前驅體形式、成熟形式及其活性形式之FXII蛋白為此項技術中所熟知。舉例而言，人類因子XII及其活性形式之前驅蛋白序列以基因庫寄存編號（GenBank Accession Number）：NP_000496.2提供。其他物種（例如非人類哺乳動物）之FXII蛋白亦為此項技術中已知的。可在此項技術中發現其結構資訊，例如使用人類FXII序列作為查詢自公開可用之基因資料庫鑑別。

【0030】 「活性」或「功能性」因子XII係指保持生物活性的因子XII多肽或因子XII多肽片段，該生物活性類似於但可並非等同於包括成熟形式之天然存在之因子XII對應物。在一些實施方式中，活性或功能性因子XII為結合至fC1-INH之因子XII多肽或因子XII多肽片段。在一些實施方式中，活性或功能性因子XII為結合至fC1-INH之因子XIIa多肽或因子XIIa多肽片段。在一些實施方式中，活性或功能性因子XII為結合至fC1-INH之因子XII_f多肽或因子XII_f多肽片段。

【0031】 在其他實例中，fC1-INH結合劑為血漿激肽釋放素（pKal），例如

天然存在之pKal蛋白之催化片段。血漿激肽釋放素為接觸系統之絲胺酸蛋白酶組分。(Sainz I.M.等人, *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007)。接觸系統藉由在暴露於異質表面或帶負電表面時的因子XIIa或在藉由脯胺醯羧基肽酶之內皮細胞表面上得以活化(Sainz I.M.等人, *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007)。血漿激肽釋放素之活化經由其因子XII之反饋活化放大內源性凝血(intrinsic coagulation)，且經由促炎性九肽緩激肽之產生促進發炎。作為循環中之初始激肽原酶，血漿激肽釋放素很大程度上引起脈管結構中之緩激肽之產生。

【0032】 pKal蛋白為此項技術中所熟知。例示性血漿激肽釋放素序列可包括人類(寄存編號：NP_000883.2)、小鼠(寄存編號：NP_032481.1)或大鼠(寄存編號：NP_036857.2)血漿激肽釋放素胺基酸序列。

【0033】 「活性」或「功能性」血漿激肽釋放素係指保持生物活性(例如蛋白酶活性)的血漿激肽釋放素多肽或血漿激肽釋放素多肽片段，該生物活性類似於但可並非等同於包括成熟形式之天然存在之血漿激肽釋放素對應物。在一些實施方式中，活性或功能性血漿激肽釋放素為結合至fC1-INH之血漿激肽釋放素多肽或血漿激肽釋放素多肽片段。

【0034】 在又其他實例中，本文所揭示之fC1-INH結合劑可為C1s及C1r，或其活性/功能性片段。C1s及C1r為補體(C1)之第一組分的經活化同源絲胺酸蛋白酶。C1s與C1r皆可與C1-INH形成複合物。Arlaud等人，(1993) *Methods Enzymol.* **223**, 61-82。C1s為模組化絲胺酸蛋白酶，其執行C1複合物之催化功能。C1r為藉由蛋白水解分裂使C1s活化成其活性形式的酶。

【0035】 C1s及C1r蛋白亦為此項技術中所熟知。舉例而言，人類C1s之前驅蛋白序列以基因庫寄存編號：NP_001725.1提供，且人類C1r之前驅蛋白序列以基因庫寄存編號：NP_001724.4提供。

【0036】 「活性」或「功能性」C1s及C1r係指保持生物活性的C1s及C1r

多肽片段，該生物活性分別類似於但可並非等同於包括成熟形式之天然存在之C1s及C1r對應物。在一些實施方式中，活性或功能性C1s或C1r片段為結合至fC1-INH之C1s多肽或C1s多肽之部分。

【0037】 fC1-INH結合劑中之任一者可經由重組技術產生，或自適合天然來源分離。

(b) C1-INH結合劑

【0038】 用於本文所揭示之LFA方法及裝置中之C1-INH結合劑可為能夠結合至C1-INH之任何分子（例如蛋白或多肽）。在一些情況下，C1-INH結合劑特異性針對fC1-INH。在其他情況下，C1-INH結合劑對功能性及非功能性C1-INH兩者具有交叉反應性。

【0039】 C1-INH結合劑可為結合C1-INH之抗體。如本文所用，術語「抗體」係指包括至少一個免疫球蛋白可變域或免疫球蛋白可變域序列之蛋白。舉例而言，抗體可包括重（H）鏈可變區（在本文中縮寫為VH）及輕（L）鏈可變區（在本文中縮寫為VL）。在另一實例中，抗體包括兩個重（H）鏈可變區及兩個輕（L）鏈可變區。術語「抗體」涵蓋抗體之抗原結合片段（例如單鏈抗體、Fab及sFab片段、F（ab'）₂、Fd片段、Fv片段、scFv及域抗體（dAb）片段）（de Wildt等人, *Eur J Immunol.* 1996; **26**（3）:629- 39.）以及完整抗體。抗體可具有結構特徵IgA、IgG、IgE、IgD、IgM（以及其亞型）。

【0040】 VH及VL區可進一步細分成高變區，稱為「互補決定區」（「CDR」），其穿插著更保守區，稱為「構架區」（「FR」）。已精確界定構架區及CDR之範圍（參見Kabat, E.A., 等人（1991） *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services*, NIH出版物第91-3242號，及Chothia, C. 等人，（1987） *J. Mol. Biol.*

196:901-917，亦參見www.hgmp.mrc.ac.uk)。本文中**使用Kabat定義**。各**VH及VL**典型地由自胺基末端至羧基末端按以下次序配置之三個**CDR**及四個**FR**構成：**FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4**。

【0041】 抗體之**VH或VL鏈**可進一步包括重鏈或輕鏈恆定區之全部或一部分，藉此分別形成重或輕免疫球蛋白鏈。在一個實施方式中，抗體為兩個重免疫球蛋白鏈及兩個輕免疫球蛋白鏈之四聚體，其中重及輕免疫球蛋白鏈藉由例如二硫鍵互連。在**IgG**中，重鏈恆定區包括三個免疫球蛋白域**CH1、CH2及CH3**。輕鏈恆定區包括**CL**域。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區典型地介導抗體與宿主組織或因子（包括各種免疫系統之細胞（例如效應細胞）及經典補體系統之第一組分（**C1q**））之結合。免疫球蛋白之輕鏈可具有**κ或λ鏈**。在一個實施方式中，抗體經糖基化。抗體之功能可為抗體依賴性細胞毒性及/或補體介導之細胞毒性。

【0042】 在一些實施方式中，結合**C1-INH**之抗體可特異性結合至**C1-INH**，例如**fC1-INH**之抗原決定基或**fC1-INH**及非功能性**C1-INH**所共有之抗原決定基。「特異性結合」於抗原或抗原決定基之抗體為此項技術中所熟知之術語，且測定如此特異性結合之方法亦為此項技術中所熟知。若抗體與特定標靶抗原之反應或締合比其與替代性標靶之反應更頻繁、更快速、持續時間更長及/或親和力更大，則稱其展現「特異性結合」。若抗體與標靶抗原或抗原決定基之結合比其結合至其他物質之親和力、親合力更大、更容易及/或持續時間更長，則其「特異性結合」於標靶抗原或抗原決定基。舉例而言，特異性（或優先）結合至抗原（例如**C1-INH**）或其中之抗原抗原決定基的抗體為結合此標靶抗原比其結合至其他抗原或相同抗原中之其他抗原決定基的親和力、親合力更大、更容易及/或持續時間更長的抗體。藉由閱讀此定義亦應理解，例如特異性結合至第一標靶抗原之抗體可或可不特異性或優先結合至第二標靶抗原。因此，「特

異性結合」或「優先結合」未必需要（儘管其可包括）獨佔式結合。一般而言，但不一定，提及結合意謂優先結合。在一些實例中，「特異性結合」於標靶抗原或其抗原決定基之抗體可不結合至其他抗原或相同抗原中之其他抗原決定基。

【0043】 用於本文所揭示之LFA方法及裝置之結合至C1-INH之抗體可具有針對C1-INH或其適合抗原決定基之適合的結合親和力。如本文所用，「結合親和力」係指表觀締合常數或KA。KA為解離常數（KD）之倒數。本文所描述之抗體之結合親和力（KD）可為至少 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M或更低。增加之結合親和力對應於降低之KD。抗體對第一抗原之親和力結合相對於第二抗原更高可由結合第一抗原之KA（或更小數值KD）比結合第二抗原之KA（或數值KD）更高指示。在如此情況下，相對於第二抗原，抗體對第一抗原具有特異性。結合親和力（例如對於特異性或其他比較）之差值可為至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500、1000、10,000或 10^5 倍。結合親和力（或結合特異性）可藉由習知方法測定。

【0044】 結合至C1-INH之抗體可為全長抗體。替代地，抗體為全長抗體之抗原結合片段。全長抗體之術語「抗原結合片段」係指保留特異性結合至相關標靶之能力的全長抗體之一或多個片段。全長抗體之術語「抗原結合片段」內所涵蓋之結合片段之實例包括（i）Fab片段，由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；（ii）F(ab')₂，包括兩個在鉸鏈區藉由二硫橋鍵連接之Fab片段的二價片段；（iii）由VH及CH1域組成之Fd片段；（iv）由單個組之抗體的VL及VH域組成之Fv片段；（v）dAb片段（Ward等人，（1989）*Nature* **341**:544-546），其由VH域組成；及（vi）保留功能性之分離之互補決定區（CDR）。此外，儘管Fv片段之兩個域VL及VH係由獨立基因編碼，但其可使用重組方法，藉由使其能夠以單一蛋白鏈形式製得之合成連接子接合，其中VL及VH區配對形成單價分子（已知為單鏈Fv(scFv)）。參見例如美國專利5,260,203、4,946,778及4,881,175；

Bird 等人, (1988) *Science* **242**:423-426; 及Huston等人, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5879- 5883。抗體片段可使用任何適當的技術, 包括熟習此項技術者已知之習知技術獲得。

【0045】 如本文所描述之結合至C1-INH之抗體中之任一者可為單株或多株抗體。「單株抗體」係指均質抗體群體且「多株抗體」係指異質抗體群體。此等兩個術語並不限制抗體之來源或製得其之方式。

【0046】 結合至C1-INH之抗體可藉由此項技術中已知之任何方法製得。參見例如, Harlow and Lane, (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。在一些實施方式中, 特異性針對C1-INH(例如人類C1-INH)之抗體可藉由習知融合瘤技術製得。在其他實施方式中, 特異性針對C1-INH之抗體可遵照習知抗體庫篩選技術自抗體庫分離。

【0047】 在一些實施方式中, 抗體為特異性結合至人類C1-INH之抗體。在一些實施方式中, 抗體為特異性結合至人類C1-INH之單株抗體。在一些實施方式中, 抗體為特異性結合至人類C1-INH之小鼠單株抗體, 諸如抗體殖株MM06或MM03(來自Sino Biological公司, 亦分別稱為10995-MM06及10995-MM03)。在一些實施方式中, 抗體為特異性結合至人類C1-INH之多株抗體。在一些實施方式中, 抗體為特異性結合至人類C1-INH之兔多株抗體, 諸如抗體殖株RP01或RP02(來自Sino Biological公司, 亦分別稱為10995-RP01及10995-RP02)。在一些實施方式中, 抗體為RP02。

(c) 銜接劑-捕捉劑

【0048】 fC1-INH結合劑及C1-INH結合劑中之一者與銜接劑共軛, 該銜接劑能夠結合至亦如本文所揭示之LFA方法及裝置中所用的捕捉劑。在一個實施方式中, 銜接劑與fC1-INH結合劑(例如FXIIa)共軛。在其他實施方式中, 銜接

劑可與C1-INH（例如結合至C1-INH之抗體）共軛。

【0049】 銜接劑及捕捉劑為受體-配位體對之成員，其係指能夠彼此結合以形成複合物之任何一對分子。在一個實例中，銜接劑及捕捉劑分別為生物素及抗生物素蛋白，或反之亦然。舉例而言，銜接劑可為生物素，且捕捉劑可為鏈黴抗生物素蛋白或聚鏈黴抗生物素蛋白。

(d) 可偵測標記

【0050】 用於如本文所揭示之LFA方法及裝置的fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑中之一者可與可偵測標記共軛。在一些實施方式中，fC1-INH結合劑與可偵測標記共軛。在其他實施方式中，C1-INH結合劑與可偵測標記共軛。替代地，捕捉劑與可偵測標記共軛。

【0051】 如本文所用，「可偵測標記」係指能夠直接或間接釋放可偵測信號之任何分子。在一些實施方式中，可偵測標記可為螢光團（例如螢光素）。如本文所用，術語「螢光團」（亦稱為「螢光標記」或「螢光色素」）係指在界定之激發波長下吸收光能且在不同波長下發射光能的部分。

【0052】 螢光團之實例包括但不限於二苯并呋喃衍生物（例如螢光素、玫瑰紅、俄勒岡綠（Oregon green）、伊紅及德克薩斯紅）、花青衍生物（例如花青、吲哚羧花青、氧雜羧花青、硫雜羧花青及部花青）、蔡衍生物（例如丹醯基及普羅丹（prodan）衍生物）、香豆素衍生物、噁二唑衍生物（例如吡啶基噁唑、硝基苯并噁二唑及苯并噁二唑）、芘衍生物（例如級聯藍（cascade blue）、噁嗪衍生物（例如尼羅紅、尼羅藍、甲酚紫及噁嗪170）、吡啶衍生物（例如原黃素、吡啶橙及吡啶黃）、芳基次甲基衍生物（例如金胺、結晶紫及孔雀綠）、四吡咯衍生物（例如卟吩、酞花青及膽紅素），或螢光蛋白（例如綠色螢光蛋白）。

【0053】 在一些實施方式中，可偵測標記為藻紅素。

【0054】 在一些實施方式中，可偵測標記為發色團（例如蔥）。在一些實施方式中，可偵測標記為半導體粒子（例如量子點）。在一些實施方式中，可偵測標記連接至半導體粒子（例如量子點）。在一些實施方式中，可偵測標記為銻。在一些實施方式中，可偵測標記為膠體金。在一些實施方式中，可偵測標記連接至金粒子。在一些實施方式中，可偵測標記連接至紅色金粒子。在一些實施方式中，可偵測標記連接至乳膠粒子。在一些實施方式中，C1-INH結合劑為與銻共軛之抗體RP02。在一些實施方式中，C1-INH結合劑為與金粒子共軛之抗體RP02。在一些實施方式中，C1-INH結合劑為與紅色金粒子共軛之抗體RP02。在一些實施方式中，C1-INH結合劑為與乳膠粒子共軛之抗體RP02。

II. LFA裝置

【0055】 在一些方面中，本文之揭示內容提供用於測量含有fC1-INH的樣本中之fC1-INH的側流分析（LFA）裝置。現參考圖1-4，其形象地說明本文所描述之例示性LFA裝置之各種實施方式。

【0056】 如圖1中所示，在一些實施方式中，裝置100包含共軛物墊200、膜300及視情況存在之吸收墊400及支撐構件500，共軛物墊200、膜片300及視情況存在之吸收墊400安裝於該支撐構件上。

【0057】 共軛物墊200直接或經由連接子與膜300連通。當裝置含有吸收墊400時，共軛物墊200及吸收墊400藉由膜300分隔開，該膜與吸收墊400直接或間接連通。在一些實施方式中，共軛物墊200與膜300重疊，例如2-6 mm，諸如3 mm，如圖2中所示。替代地或另外，膜300與吸收墊400重疊，例如2-6 mm，諸如3 mm，如圖2中所示。

【0058】 可在必要時修改共軛物墊200、膜300、吸收墊400及支撐構件500之特定特徵及尺寸以實現所需結果。如圖2中所示，在一些實施方式中，支撐膜

之長度為80 mm，其為共軛物墊（42 mm）、膜（25 mm）及吸收墊（19 mm）之組合長度減去膜上之樣本墊及吸收墊的重疊（3 mm，3 mm）。

【0059】 如圖3A，裝置100之俯視圖中所示，裝置可包含在一些實施方式中，適用於固定如本文所描述之fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕獲劑的各個區域（210、220、230）。在一些實施方式中，裝置100包含第一區域210及第二區域220，其可在共軛物墊200上；及第三區230，其可在膜300上。

【0060】 fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑中之每一者可固定於區域210、220及230（其可按任何次序）中之一者上。此等試劑中之任一者可使用此項技術中已知之任何方式固定。試劑可直接或間接固定於或結合於共軛物墊200及/或膜300之表面。在一些實施方式中，結合劑經由共價鍵固定於表面。在一些實施方式中，結合劑經由非共價鍵固定於表面。在一些實施方式中，結合劑經由連接子固定於表面。連接子之實例包括但不限於含碳鏈、聚乙二醇（PEG）、核酸、單醣單元、生物素、抗生物素蛋白及肽。

【0061】 在一些實施方式中，諸如FXIIa之fC1-INH結合劑固定在第一區域210上。fC1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第二區域220上。C1-INH結合劑可與可偵測標記，諸如本文所揭示之彼等共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第三區域230上。

【0062】 在一些實施方式中，諸如FXIIa之fC1-INH結合劑固定在第一區域210上。fC1-INH結合劑可與可偵測標記，如本文所描述之彼等共軛。諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第二區域220上。C1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第三區域230上。

【0063】 在一些實施方式中，諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑

可固定在第一區域**210**上。C1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如FXIIa之fC1-INH結合劑可固定在第二區域**220**上。fC1-INH結合劑可與可偵測標記，諸如本文所描述之彼等共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第三區域**230**上。

【0064】 在一些實施方式中，諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第一區域**210**上。C1-INH結合劑可與可偵測標記，諸如本文所描述之彼等共軛。諸如FXIIa之fC1-INH結合劑可固定在第二區域**220**上。fC1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第三區域**230**上。

【0065】 在一些實施方式中，諸如FXIIa之fC1-INH結合劑固定在第一區域**210**上。fC1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第二區域**220**上。捕捉劑可與可偵測標記，諸如本文所揭示之彼等共軛。諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第三區域**230**上。

【0066】 在一些實施方式中，諸如FXIIa之fC1-INH結合劑固定在第一區域**210**上。fC1-INH結合劑可與可偵測標記，諸如本文所描述之彼等共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第二區域**220**上。諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第三區域**230**上。C1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。

【0067】 在一些實施方式中，諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第一區域**210**上。C1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第二區域**220**上。捕捉劑可與可偵測標記，諸如本文所揭示之彼等共軛。諸如FXIIa之fC1-INH結合劑可固定在第三區域**230**上。

【0068】 在一些實施方式中，諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在第一區域**210**上。C1-INH結合劑可與可偵測標記，諸如本文所描述之彼等共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第二區域**220**上。諸如FXIIa之fC1-INH結合劑可固定在第三區域**230**上。fC1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。

【0069】 本文所揭示之LFA裝置中之任一者可進一步包含第4區域**240**，其可用於置放樣本，諸如本文所描述之彼等，及視情況存在之第5區域**250**，其可用於置放緩衝溶液。

【0070】 第5區域**250**可位於裝置之一端，使得當緩衝溶液置放於第5區域**250**上時，緩衝溶液可自第1區域**210**朝向第3區域**230**流動穿過裝置。在一些實例中，第5區域**250**可與第1區域**210**重疊。參見圖3B。在此情況下，諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑可固定在與第5區域**250**重疊之第1區域**210**上。C1-INH結合劑可與可偵測標記共軛。

【0071】 替代地或另外，第4區域**240**可位於第5區域**250**與第2區域**220**之間。在一些情況下，第4區域**240**與第2區域**220**可重疊。參見圖3B。可與諸如生物素之銜接劑共軛之諸如FXIIa之fC1-INH結合劑可固定在第2區域**220**上。

【0072】 如圖4中所示，在一些實施方式中，裝置**100**可進一步包含外殼**600**，其可為可移除的。在外殼中之如本文所描述之裝置的影像顯示於圖5中。外殼**600**可經裝配以暴露裝置**100**之共軛物墊**200**及膜**300**之至少一部分。在一些實施方式中，外殼**600**包含第一開口以形成緩衝液口**610**，其可與第一區域**210**對準。外殼**600**可進一步包含第二開口以形成取樣口**620**，其可與第二區域**220**對準。另外，外殼**600**可包含第三開口以形成測試窗口**630**，其可與第三區域**230**對準。

【0073】 在一些實施方式中，諸如結合至C1-INH之抗體的C1-INH結合劑

固定在與緩衝液口**610**對準之第1區域**210**上。圖4。C1-INH結合劑可與可偵測標記，諸如本文所描述之彼等共軛。諸如FXIIa之fC1-INH結合劑可固定在第2區域**220**上，其可與取樣口**620**對準。fC1-INH結合劑可與諸如生物素之銜接劑共軛。諸如抗生物素蛋白（例如鏈黴抗生物素蛋白）之捕捉劑可固定在第3區域**230**上，其可與測試窗口**630**對準。

【0074】 在一些實例中，樣本可置放於取樣口**620**中，使得在其中的fC1-INH與FXIIa-生物素共軛物的結合。緩衝溶液可置放於緩衝液口**610**中，使得在第1區域**210**上之C1-INH結合劑與緩衝溶液一起朝向第2區域**220**遷移。當在第2區域**220**使C1-INH結合劑與fC1-INH-FXIIa複合物接觸時，形成C1-INH結合劑/fC1-INH/FXIIa-生物素之複合物。此複合物將與緩衝溶液一起朝向第3區域**230**遷移，且經由在第3區域**230**的生物素與鏈黴抗生物素蛋白之間的相互作用在第3區域**230**經捕捉。可測量在與測試窗口**630**對準之第3區域**230**自與C1-INH結合劑共軛之可偵測標記釋放的信號，其指示樣本中fC1-INH之存在或量。

【0075】 替代地或另外，外殼**600**可為透明的，以便於觀測取樣口**610**及/或緩衝液口**620**及/或測試窗口**630**。在一些實施方式中，外殼之一部分為透明的。在一些實施方式中，整個外殼**600**為透明的。

【0076】 在一些實施方式中，外殼**600**包含便於鑑別樣本或結果之標記。在一些實施方式中，外殼**600**包含一或多個標記以便於鑑別測試窗口**630**中之結果。在一些實施方式中，一或多個標記鑑別樣本結果。

【0077】 應瞭解，如本文所描述之裝置之各種實施方式，包括裝置中之多個組件（例如共軛物墊、膜、吸收墊及支撐構件）可用適合之材料形成，例如用任何適合之共軛物墊、用任何適合之吸收墊、用任何適合之支撐構件、用任何適合之結合劑及用其任何適合之組合。

【0078】 舉例而言，如本文所揭示之LFA裝置中之膜**300**可為任何適合之

膜，包括但不限於硝化纖維素膜、耐綸膜、纖維素膜、聚偏氟乙烯膜、聚碳酸酯膜、聚丙烯膜、聚乙烯膜、聚四氟乙烯膜及聚對伸苯基對苯二甲醯胺膜。在一些實施方式中，膜為硝化纖維素膜。

【0079】 任何適合之支撐構件可用於本文所描述之裝置中。在一些實施方式中，支撐構件包含金屬。在一些實施方式中，支撐構件包含塑膠。在一些實施方式中，支撐構件包含選自由以下者組成之群的塑膠：苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯及聚氯乙烯。

【0080】 任何適合之墊可用作本文所描述之裝置中之共軛物墊。在一些實施方式中，共軛物墊包含纖維素或玻璃纖維。在一些實施方式中，吸收墊包含纖維素或玻璃纖維。

【0081】 本文所提供之裝置可進一步包含樣本墊。在一些實施方式中，樣本墊包含纖維素或玻璃纖維。

【0082】 應瞭解，本發明之各種實施方式可由上述部件中之一或多者形成。本發明之上述方面及部件可以任何適合的組合使用，因此本發明就此而言不受限制。亦應瞭解，圖式說明可併入至本發明之各種實施方式中的各種組件及部件。為了簡化，一些圖式可說明超過一種視情況存在之部件或組件。然而，本發明不限於圖式中所揭示的特定實施方式。應認識到，本發明涵蓋可包括任一圖式中所說明之組件之僅一部分的實施方式，且/或亦可涵蓋不同圖示中所說明之組合組件的實施方式。

III. 功能性C1-INH之測量

【0083】 本文亦提供用於偵測及/或定量樣本中之功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之方法。本文所揭示之分析方法涉及使用fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑，其均揭示於本文中。fC1-INH結合劑及C1-INH試劑中之一者與

結合捕捉劑之銜接劑共軛。fC1-INH結合劑、C1-INH試劑及捕捉劑中之一者與可偵測標記共軛。可偵測標記及銜接劑與不同試劑共軛。

【0084】 為了進行本文所揭示之分析方法，可在允許形成包含fC1-INH、fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑（經由與銜接劑（其與fC1-INH結合劑或C1-INH結合劑共軛）之相互作用）之複合物的條件下使疑似含有fC1-INH之樣本與fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑接觸。樣本中fC1-INH之存在或量可藉由測量自可偵測標記釋放之信號來偵測及/或定量，該可偵測標記可與fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑中之任一者共軛。

【0085】 在一些實例中，樣本及fC1-INH結合劑（例如FXIIa）可首先培育適合之時間段（例如至少5分鐘，諸如5-10分鐘）以允許形成fC1-INH/FXIIa複合物。複合物可隨後與C1-INH結合劑，諸如結合至C1-INH之抗體一起培育，以形成三組分複合物，該三組分複合物可隨後與結合銜接劑（其與fC1-INH結合劑或C1-INH結合劑共軛）之捕捉劑接觸。可測量自與最終複合物中之一種組分共軛之可偵測標記釋放的信號，以測定樣本中fC1-INH之存在/不存在及/或量。

【0086】 在一些實施方式中，本發明提供用於偵測及/或定量fC1-INH的方法，其包含（i）使樣本與fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑接觸以形成複合物，其中fC1-INH結合劑及C1-INH試劑中之一者與結合捕捉劑之銜接劑共軛，且其中fC1-INH結合劑、C1-INH試劑及捕捉劑中之一者與可偵測標記共軛，可偵測標記及銜接劑與不同試劑共軛；及（ii）偵測自複合物中之可偵測標記釋放之信號；其中自複合物中之可偵測標記釋放之信號的存在指示樣本中之fC1-INH的存在。

【0087】 本文所描述之方法涵蓋以任何適合之方式固定在任何適合之受質上的捕捉劑。受質之實例包括但不限於珠粒、粒子、載玻片及多孔盤。在一些實施方式中，捕捉劑共價結合至受質。在一些實施方式中，捕捉劑非共價結

合至受質。在一些實施方式中，捕捉劑例如經由連接子間接結合至受質。

【0088】 在一些實施方式中，本文所揭示之分析方法可使用本文所揭示之LFA裝置中之任一者進行。舉例而言，可將樣本置放於取樣口**620**中（圖4）且可將緩衝溶液置放於緩衝液口**610**中。取樣口**620**可與第2區域**220**對準。緩衝液口**610**可與第1區域**210**對準。緩衝溶液將自例如第1區域**210**朝向第2區域**220**及第三區域**230**流動，以及使樣本及fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及/或捕捉劑固定在第1區域**210**及第2區域**220**上。當緩衝溶液穿過第1區域**210**、第2區域**220**及第3區域**230**時，此允許樣本與fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑接觸，以使得可形成包含樣本中之fC1-INH、fC1-INH結合劑、C1-INH結合劑及捕捉劑之複合物。樣本中之fC1-INH之存在或量可藉由測量自可偵測標記（其與複合物中之一種組分共軛）釋放之信號來測定。

【0089】 在一個實例中，描述用LFA裝置（其包含FXIIa-生物素及與鎔粒子共軛之抗C1-INH抗體，例如經裝配為如圖4中所示之裝置）偵測及/或定量fC1-INH的方法僅出於說明之目的。在此實例中，與鎔粒子共軛之抗C1-INH抗體充當與偵測標記共軛之C1-INH結合劑，且抗C1-INH抗體共軛物固定在第一區域**210**中。與生物素共軛之FXIIa充當與銜接劑共軛之fC1-INH結合劑，且FXIIa-生物素固定於第二區域**220**中。為了偵測樣本中fC1-INH之存在，將樣本經由取樣口**620**置放於共軛物墊**200**上之第二區域**220**。當樣本接觸第二區域**220**中之FXIIa-生物素時，樣本中之fC1-INH結合至FXIIa，藉此形成FXIIa-生物素:fC1-INH複合物。

【0090】 如本文所用，術語「接觸」係指樣本與一或多種結合劑暴露持續適合時間段，該時間段足以在樣本中形成與fC1-INH及/或C1-INH之複合物（若存在）。在一些實施方式中，樣本及/或緩衝液經由毛細作用接觸一或多種結合劑，其中樣本及/或緩衝液在共軛物墊或膜上移動。

【0091】 緩衝液可經由緩衝液口**610**置放於共軛物墊**200**上之第一區域**210**。在將樣本置放於第二區域**220**之後的任何時間，可將緩衝液置放於第一區域**210**，例如可在將樣本置放於裝置中之後至少5分鐘之後置放緩衝液。緩衝液溶解抗C1-INH抗體共軛物，且經由毛細作用使其沿著共軛物墊**200**自第一區域**210**朝向膜**300**移動。當緩衝液到達第二區域**220**時，其接觸FXIIa-生物素:fc1-INH複合物，且緩衝液中之抗C1-INH抗體共軛物結合至與FXIIa-生物素複合之fc1-INH，藉此形成「夾層」。在此實例中，fc1-INH夾層因此包含結合至fc1-INH的與生物素共軛之FXIIa，其藉由與鎔粒子共軛之抗C1-INH抗體而結合。

【0092】 包含fc1-INH夾層之緩衝液繼續向上移動共軛物墊**200**至膜**300**，鏈黴抗生物素蛋白在第三區域**230**（例如測試線）固定在該膜上。在此實例中，鏈黴抗生物素蛋白充當結合至銜接劑，特異性為生物素之捕捉劑。當緩衝液與第三區域**230**之鏈黴抗生物素蛋白接觸時，fc1-INH夾層中之生物素結合至第三區域**230**之鏈黴抗生物素蛋白，藉此捕捉fc1-INH夾層。隨後基於來自第三區域**230**之鎔粒子的信號之存在經由測試窗口**630**偵測樣本中fc1-INH之存在。fc1-INH夾層之偵測不限於經由鎔粒子偵測。舉例而言，fc1-INH之存在可經由顏色或pH之可偵測變化來偵測。若樣本中不存在fc1-INH，則未形成fc1-INH夾層，且未在第三區域**230**偵測到信號。

【0093】 在移動至第三區域**230**中之後，樣本繼續向上移動膜**300**至吸收墊**400**中，其充當芯體以將樣本向上拉動，因此自第三區域**230**移除任何背景材料。

【0094】 本文所提供之方法涵蓋偵測及/或定量各種樣本中之fc1-INH或其缺乏。在一些實施方式中，樣本為獲自個體之生物樣本。在一些實施方式中，生物樣本為血清樣本、血漿樣本或血液樣本。在一些實施方式中，樣本係獲自疑似患有fc1-INH缺乏介導之病症（例如HAE）或處於該病症風險下之個體。

【0095】 在一些實施方式中，生物樣本為獲自個體之血液樣本，例如全

血。全血包含紅血球、白血球、血小板及血漿。在一些實施方式中，可自血管（例如毛細血管、靜脈及動脈）收集血液樣本。在一些實施方式中，血液樣本可藉由產生血液滴之手指針刺而獲得。在一些實施方式中，在獲得血液樣本之後，在2-8°C下處理血液樣本。對於血漿或血清製備，可在藉由離心進行血液收集之後製備血漿或血清。在分析之前，血漿及血清樣本可儲存在-80°C下。

【0096】 在一些實施方式中，本文所描述之方法及/或裝置可進一步包含對照線。如一般熟習此項技術者將理解，可使用對照線以確保方法及/或裝置如預期起作用，例如偵測fC1-INH。

IV. LFA方法及裝置之應用

【0097】 本文所描述之方法及裝置可應用於疾病之評價，例如疾病之診斷或預後。評價可包括鑑別個體係處於如本文所描述之疾病，例如fC1-INH缺乏介導之病症的風險下還是患有該疾病。評價亦可包括監測疾病之治療，諸如評價治療fC1-INH缺乏介導之病症之有效性。fC1-INH缺乏介導之病症的實例包括但不限於遺傳性血管性水腫（例如I型及/或II型HAE）、獲得性血管性水腫（例如I型及/或II型AAE）、C1-INH缺乏相關免疫疾病（例如全身性紅斑狼瘡症（SLE）及C1-INH缺乏相關癌症（例如淋巴瘤））。

【0098】 在一些實施方式中，本文所用之方法及裝置用於評價個體是否患有遺傳性血管性水腫或處於遺傳性血管性水腫之風險。一般而言，存在不同類型之遺傳性血管性水腫，其展現類似發炎反應但其病因不同。舉例而言，I型HAE與功能性但低量之C1-INH相關，而II型HAE與以正常濃度存在之非功能性C1-INH相關。

A. 診斷

【0099】 在一些實施方式中，本文所描述之方法及裝置用於測定自個體（例如疑似患有fC1-INH缺乏介導之病症，諸如HAE之人類患者）收集之生物樣本（例如血清樣本或血漿樣本或血液樣本）中的fC1-INH之量。隨後將fC1-INH量與參考值相比，以確定個體是否患有fC1-INH缺乏介導之病症或處於該疾病風險下。參考值可為能夠結合至如本文所描述之fC1-INH結合劑（例如FXIIa）的fC1-INH之對照量。在一些實施方式中，對照量為能夠結合至fC1-INH結合劑之對照樣本中fC1-INH之量。在一些實施方式中，對照樣本獲自健康個體或健康個體群體。如本文所用，健康個體為在測量fC1-INH之量時明顯沒有fC1-INH缺乏介導之病症或無疾病病史的個體。

【0100】 對照量亦可為預定量。如此預定量可表示不患有fC1-INH缺乏介導之病症或不處於該病症風險下的個體群體中的fC1-INH之量。預定量可呈多種形式。舉例而言，其可為單個閾值，諸如中值或平均值。在一些實施方式中，如此預定量可基於比較組確立，諸如其中一個經界定組已知為患有目標疾病而另一經界定組已知為不患有目標疾病。替代地，預定量可為一範圍，例如表示預定百分點內之對照群體中的fC1-INH之量之範圍。

【0101】 如本文所描述之對照量可藉由各種方法測定。在一些實施方式中，可藉由執行已知方法獲得對照量。在一些實施方式中，可藉由進行用於確定來自個體之樣本中的fC1-INH之量的相同分析獲得對照量。在一些實施方式中，可藉由執行本文所描述之方法獲得對照量。在一些實施方式中，可用本文所描述之裝置獲得對照量。在一些實施方式中，可自對照群體之成員獲得對照量，且結果可藉由例如計算程式分析，以獲得表示對照群體中fC1-INH之量的對照量（預定量）。

【0102】 藉由將自個體獲得之樣本中能夠結合至fC1-INH結合劑之fC1-INH的量與如本文所描述之參考值進行比較，可以確定個體是否患有

fC1-INH缺乏介導之疾病（例如HAE）或處於該疾病風險下。舉例而言，若結合至個體之fC1-INH結合劑的fC1-INH之量偏離參考值（例如相較於參考值降低），則候選個體可鑑別為患有fC1-INH缺乏介導之疾病（例如HAE）或處於該疾病風險下。本文所揭示之分析可用於預定表示正常個體中之fC1-INH之閾值。如此閾值可用於確定個體是否患有fC1-INH缺乏介導之病症（例如HAE）或處於該病症風險下。在一些情況下，個體中fC1-INH之量低於閾值可指示疾病風險或發生率。

【0103】 如本文所用，「降低之量或低於參考值之量」意謂結合至fC1-INH結合劑的fC1-INH之量低於參考值，諸如預定臨限值或對照樣本中結合至fC1-INH結合劑的fC1-INH之量。

【0104】 結合至fC1-INH結合劑的fC1-INH之降低之量包括，即例如比參考值低50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更大的fC1-INH量。結合至fC1-INH結合劑的fC1-INH之降低之量亦包括，將非零狀態（例如結合至樣本中fC1-INH結合劑的fC1-INH有一些或可偵測）之現象減小至零狀態（例如結合至樣本中fC1-INH結合劑的fC1-INH並沒有或不可偵測）。

【0105】 在一些實施方式中，個體為具有fC1-INH缺乏介導之疾病（例如本文所揭示之彼等，諸如HAE）之症狀的人類患者。舉例而言，個體具有水腫、腫脹（其中該腫脹完全或主要為外周）；蕁麻疹；發紅、疼痛及在不存在感染跡象下之腫脹；非組織胺介導之水腫、腫脹復發性發作或其組合。在一些實施方式中，在收集樣本時個體不具有fC1-INH缺乏介導之疾病之症狀、不具有fC1-INH缺乏介導之疾病之症狀之病史、或不具有諸如HAE之fC1-INH缺乏介導之疾病之病史。在一些實施方式中，個體對抗組織胺療法、皮質類固醇療法或兩者具有抗性。

【0106】 fC1-INH缺乏介導之疾病的實例包括但不限於：非組織胺依賴性

特發性血管性水腫、類風濕性關節炎、克羅恩氏病 (Crohn's disease)、狼瘡、阿茲海默氏病 (Alzheimer's disease)、敗血性休克、燒傷、腦局部缺血/再灌注損傷、腦水腫、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性腎病變、黃斑水腫、血管炎、動脈或靜脈血栓、與心室輔助裝置或血管支架相關之血栓、肝素誘導之血小板減少伴血栓、血栓性疾病，及冠狀動脈心臟病伴不穩定型心絞痛、水腫、眼病、痛風、腸道疾病、口腔黏膜炎、神經性病變疼痛、發炎性疼痛、脊骨狹窄-退行性脊柱疾病、手術後腸阻塞、主動脈瘤、骨關節炎、遺傳性血管性水腫、肺栓塞、中風、頭部創傷或瘤周腦水腫、敗血症、急性中大腦動脈 (MCA) 局部缺血事件 (中風)、再狹窄 (例如血管成形術後)、全身性紅斑狼瘡腎炎、自體免疫疾病、發炎性疾病、心血管疾病、神經疾病、與蛋白摺疊異常相關之疾病、與血管產生相關之疾病、高血壓腎病變及糖尿病性腎病變、過敏性及呼吸道疾病 (例如嚴重過敏、哮喘、慢性阻塞性肺病、急性呼吸窘迫症候群、囊腫性纖維化、持續性鼻炎) 及組織損傷 (例如燒傷或化學性傷害)。

B. 評價治療有效性

【0107】 亦可應用本文所描述之方法及裝置以評價治療fC1-INH缺乏介導之疾病 (例如HAE) 之有效性。舉例而言，可在治療之前及之後或在治療過程期間自進行治療之個體收集多個生物樣本 (例如血清、血漿或血液樣本)。fC1-INH之量可藉由本文所描述之任何方法測量。若在治療之後或在治療過程期間fC1-INH之量增加 (後續收集樣本中的fC1-INH之量與較早收集樣本中的量相比)，保持不變或增加，則其指示該治療為有效的。

【0108】 若個體經鑑別對治療無反應，則向所鑑別之個體投予更高劑量及/或給藥頻率之治療劑。在一些實施方式中，在經鑑別為對治療有反應或不需要進一步治療之個體中，保持、降低或停止治療劑之劑量或給藥頻率。替代地，

可將不同治療應用於經發現對第一治療無反應之個體。

【0109】 治療劑包括但不限於激肽釋放素結合劑、緩激肽B2受體拮抗劑、C1-INH置換劑、DX-2930及DX88（參見例如PCT公開案第WO 2014/113701號，其以全文引用之方式併入本文中）。

實施例

【0110】 為了可更充分理解本文中所描述之裝置及方法，闡述以下實施例。提供本申請案中所描述之實施例以說明本文所提供之方法及組成物，且不應理解為以任何方式限制其範疇。

實施例1：製備用於偵測及/或定量功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之側流分析（LFA）裝置

膜之剝離

【0111】 FRONTLINE HR™（BioDot）用於剝離膜。用10個循環的洗滌緩衝液（0.05% BIO-TERGE®（Stepan公司）於diH₂O中）洗滌前線，且對準以使得測試線自膜底部分配11 mm。清空前線且用含0.5 mg/mL聚鏈黴抗生物素蛋白之10 mM磷酸鹽，pH 7.3、0.5%蔗糖預致敏。將聚鏈黴抗生物素蛋白之測試線剝離於膜上（參見例如圖3A中之膜300上的第三區域230）。隨後，標記膜且在40℃下乾燥30分鐘。在剝離之後用10個循環的洗滌緩衝液洗滌前線。用於剝離膜之組分顯示於表1中。

表1.用於膜之剝離的組分.

組分	級別	供應商	零件編號	每毫升量
0.5 M 磷酸鈉，pH 7.3	N/A	DCN	10026	可變
聚鏈黴抗生物素蛋白	N/A	Biotez	PolyStrept R	

蔗糖	ACS	Sigma	S5500	5 mg
水 (diH2O)	≥18 M ohm	Thermo	≥18 M ohm	QS 至最終體積
0.05% BIO-TERGE®	N/A	DCN	N/A	N/A
膜 (25 mm x 300 mm)	CN95	Sartorius	1UN95ER1000025NTB	N/A
前線剝離機	N/A	BioDot	XYZ 3210	N/A
大箔包	IMPAK	125MF518	大箔包	大箔包
乾燥劑, 0.5 g	IMPAK	39SG03	乾燥劑, 0.5 g	乾燥劑, 0.5 g

共軛物墊之剝離

【0112】 使用FRONTLINE HR™ (BioDot) 將抗C1-INH Eu粒子共軛物及FXIIa-生物素剝離於共軛墊(Ahlstrom)上。在剝離共軛物墊之前，將抗C1-INH Eu粒子共軛物稀釋至0.04 w/v於Eu乳膠稀釋劑中，且將FXIIa-生物素稀釋至2.4 μM於FXIIa-生物素稀釋劑中。隨後，用10個循環的洗滌緩衝液(0.05% BIO-TERGE® (Stepan公司)於diH₂O中)洗滌前線。對準前線以使得抗C1-INH Eu粒子共軛物自共軛物墊底部剝離15 mm，且FXIIa-生物素共軛物分別以10及2.5 μL/cm之速率自共軛物墊頂部剝離8 mm。抗C1-INH Eu粒子共軛物及FXIIa-生物素共軛物之位置分別與定製SLA外殼卡匣中之緩衝液口及取樣口對準。

【0113】 清空前線且用任一共軛物預致敏。將共軛物剝離於共軛物墊上，其隨後經標記且在40°C下乾燥30分鐘。將共軛物墊密封且乾燥。在剝離之後用10個循環的洗滌緩衝液洗滌前線。用於剝離共軛物墊之組分顯示於表2中。Eu乳膠稀釋劑及FXIIa-生物素稀釋劑之組分分別顯示於表3及表4中。

表2.用於共軛物墊之剝離的組分

組分	級別	供應商	零件編號
共軛物墊 (42 mm x 300 mm)	玻璃纖維	Ahlstrom	8951
抗 C1-INH Eu 粒子	N/A	DCN	如在 NBR 715-001 中製備
FXIIa-生物素	N/A	Enzyme Research	HFXIIa 生物素 3790

		Labs	
FXIIa-生物素稀釋劑： 10 mM Tris pH 8，0.1% Tween-20，2%酪蛋白，10%蔗糖，4%繭蜜糖，0.25%綠色食用色素	N/A	DCN	N/A
Eu 乳膠稀釋劑： 10 mM Tris pH 8，0.1% Tween-20，2%酪蛋白，10%蔗糖，4%繭蜜糖	N/A	DCN	N/A
前線剝離機	N/A	BioDot	XYZ 3210
大箔包	N/A	IMPAK	125MF518
乾燥劑，0.5 g	N/A	IMPAK	39SG03

表3.用於Eu乳膠稀釋劑之組分

組分	級別	供應商	零件編號	每毫升量
Tris-HCl	試劑	Sigma	T3253	N/A
6%酪蛋白於 50 mM Tris，pH 8,5 中，7 天固化	N/A	DCN	如 21NOV21085M 製備	N/A
Tween-20	BioXtra	Sigma	P7949	10 µL
蔗糖	ACS	Sigma	S5500	100 mg
繭蜜糖	ACS	Fisher	BP2687100	N/A
水（diH2O）	≥18 M ohm	Thermo	≥18 M ohm	QS 至最終體積

表4.用於FXIIa-生物素稀釋劑之組分

組分	級別	供應商	零件編號	每毫升量
Tris-HCl	試劑	Sigma	T3253	N/A
6%酪蛋白於 50 mM Tris，pH 8,5 中，7-天固化	N/A	DCN	如 21NOV21085M 製備	N/A
Tween-20	BioXtra	Sigma	P7949	10 µL
蔗糖	ACS	Sigma	S5500	100 mg
繭蜜糖	ACS	Fisher	BP2687100	N/A
綠色食用色素	食品級	Vons	N/A	2.5 µL
水（diH2O）	≥18 M ohm	Thermo	≥18 M ohm	QS 至最終體積

製備抗C1-INH Eu粒子共軛物

【0114】 為了製備抗C1-INH Eu粒子共軛物，使用製造商的方案將0.1 mg

抗C1-INH抗體經由ZEBATM旋轉柱（Thermo Fisher）交換至50 mM硼酸鹽，pH 8中。藉由吸光度（ A_{280} ，1 mm，1 OD=1.4 mg/mL）測定抗體濃度。將儲備乳膠旋轉10分鐘，且隨後使用微尖超音波發生器（設置25）音波處理10-15秒。儲備乳膠溶液（10%）稀釋至1%於0.1 M MES，pH 6.5中，且在17,000 g下經微量離心10分鐘。移除上清液，且使糰粒再懸浮於0.1 M MES，pH 6.5中，其中緩衝液體積等於乳膠之起始體積。如先前所描述對所得溶液進行音波處理、微量離心且再懸浮。

【0115】 為了製備含15 mg/mL EDC之0.1 M MES緩衝液，使EDC平衡至室溫，且稱重。在用於製備抗C1-INH Eu粒子共軛物之10分鐘內製備EDC溶液。將EDC原料粉末乾化且在-20°C下冷凍以用於長期儲存。

【0116】 為了製備含50 mg/mL磺酸基-NHS之0.1 M MES緩衝液，使磺酸基-NHS平衡至室溫，且稱重。在用於製備抗C1-INH Eu粒子共軛物之10分鐘內製備磺酸基-NHS溶液。藉由在振盪器上在1000 rpm下培育30分鐘來活化磺酸基-NHS溶液。在17,000 g下將溶液微量離心8分鐘。將糰粒再懸浮於50 mM硼酸鹽緩衝液中，渦旋且音波處理。緩衝液體積等於乳膠溶液之起始體積（600 μ L）。隨後將溶液微量離心，再懸浮於硼酸鹽緩衝液（300 μ L）中，渦旋且音波處理，如先前所描述。將活化粒子等分至50 μ L/管中，且添加適量緩衝液及蛋白（例如20 μ g蛋白（亦即抗體））以獲得粒子與蛋白之質量與質量比為20:1。在添加緩衝液及蛋白之後立即使管渦旋。

【0117】 在室溫下在振盪器上在1,000 rpm下培育管2小時。在培育之後，添加10 μ L/mL之1 M乙醇胺，且在室溫下在振盪器上在1,000 rpm下培育管30分鐘。將管在17,000 g下微量離心10分鐘，且使糰粒再懸浮於1%酪蛋白7天固化且在振盪下培育隔夜。在隔夜培育之後，將管微量離心，且將糰粒再懸浮於1%酪蛋白7天固化中，渦旋且音波處理。隨後將粒子共軛物剝離於如本文所描述之共

軛物墊上。用於抗C1-INH Eu粒子共軛物之組分顯示於表5中。

表5.抗C1-INH Eu粒子共軛物

組分	級別	供應商	零件編號	每毫升量
抗 C1-INH 抗體	N/A	Shire	AbD28387.2	0.05 mg
Eu 乳膠粒子，0.2 μm	N/A	Thermo	93470520010150	1 mg
共軛物 儲存 稀釋劑：10 mM Tris pH 8，1%酪蛋白	DCN	DCN	N/A	1 mL
0.1 M MES，pH 6.5	N/A	DCN	N/A	N/A
0.1 M 硼酸鹽，pH 8	N/A	DCN	10061	N/A
水（diH2O）	≥18 M ohm	Thermo	≥18 M ohm	QS 至最終體積
6%酪蛋白於 50 mM Tris，pH 8.5 中，7 天固化	N/A	DCN	如 21NOV2108SM 製備	N/A
EDC	N/A	Thermo	22980	N/A
NHS	N/A	Thermo	24500	N/A
乙醇胺	N/A	TCI	A0297	N/A
科學離心	N/A	Thermo	Legend XTR	N/A
微盤混合器	N/A	Scilogex	82200004SX	N/A
超音波發生器	N/A	Qsonica	Q55	N/A

將組分層壓於襯底卡上

【0118】 為將組分層壓於80 mm長之襯底卡（DCN）上，使用直緣剃刀片自卡底部在39 mm處切割襯底貼紙。將襯底貼紙自卡頂部上之39 mm位置移除。膜自卡底部在39 mm處黏附至卡。吸收墊（Ahlstrom）黏附至卡頂部，使得墊與膜頂部重疊3 mm。移除剩餘襯底貼紙，且將共軛物墊黏附至卡底部以使得墊與膜底部重疊3 mm。組分及組分次序分別顯示於表6及表7中。

表6.卡組分

組分	材料	長 度 (mm)	自條帶底部之位置 (mm)
膜	Sartorius CN95	25 mm	39 mm
共軛物墊	Ahlstrom 8951	42 mm	N/A
芯吸墊	Ahlstrom 243	19 mm	61 mm

(吸收墊)			
襯底卡 (支撐膜)	DCN P/N P12-651	80 mm	N/A
測試線之位置		自膜底部邊緣 11 mm (中心)。總計 1 mm 寬。	
總條帶寬度		5.0 mm	

表7.層壓組分次序、定向及位置

次序#	組分	定向	自卡底部之位置	膜上之重疊
1	經剝離之膜	膜側朝上，測試線最接近卡底部	39 mm	N/A
2	吸收墊	光滑側朝下	61 mm	3 mm
3	經剝離之共軛墊	Eu 共軛物最接近卡底部	N/A	3 mm

製備測試條帶

【0119】 將卡置放於Kinematic Cutter (Kinematic) 中，且將卡切割成5.0 mm寬條帶。丟棄短於5.0 mm之條帶或在剝離期間已用筆標記之條帶。將切割條帶置放於具有乾燥劑之箔包中。將箔包密封且儲存於乾燥箱中直至使用。

實施例2：LFA裝置用於偵測來自患者之血漿樣本中的功能性C1-酯酶抑制子 (fC1-INH) 之用途.

【0120】 為進行側流分析 (LFA) 以便測定fC1-INH濃度，將如以上實施例1中所描述製備之測試條帶置放於定製立體微影 (SLA) 卡匣中 (參見例如圖4)。藉由將C1-INH參考標準物 (批號TCP103, Shire, Takeda公司) 外加至C1-INH耗竭之人類K3-EDTA血漿 (由Shire, Takeda公司製備) 來製備標準物及品質對照組。使用含有0 mU/mL至800 mU/mL經純化之C1-INH的對照樣本產生校準曲線。將對照樣本於C1-INH耗竭之培養基中以1:20稀釋。將樣本添加至取樣口中且培育5分鐘。將流動緩衝液 (30 µL) 添加至取樣口，讓樣本流至膜上且直至測試窗口。接著將流動緩衝液 (150 µL) 添加至緩衝液口，且再培育卡匣20分鐘。

自卡匣移除測試條帶，且使用Axxin AX-2X螢光讀取器（Axxin）測量測試線區域之強度。卡匣中之測試條帶的影像顯示於圖5中。測試線區域之測量強度相對於C1-INH濃度作圖以產生圖6中所示之校準曲線，且得到 R^2 為0.97。

【0121】 商業上獲得五十個正常K3-EDTA血漿樣本且在患者同意下使用來自SAHARA、III期、隨機、雙盲、安慰劑對照、雙期、三序列、部分交叉研究之五十個HAE血漿樣本，評價皮下注射投予2000 IU C1酯酶抑制子[人類]液體預防患有HAE之青少年及成年人之血管性水腫發作的功效及安全性。

【0122】 接著利用圖6之校準曲線測定來自對照個體及患有遺傳性血管性水腫（HAE）之個體之血漿樣本中的fC1-INH濃度。簡言之，將來自個體之血漿樣本於C1-INH耗竭之血漿中以1:20稀釋。將經稀釋之血漿樣本（20 μ L）添加至取樣口，且培育5分鐘。使用測試條帶測定之fC1-INH濃度在ELISA測定之濃度值之20%內。

【0123】 如圖8中所示，相比於兩種方法中之健康對照組，HAE個體中之C1-INH量較低。所測量之平均C1-INH濃度，對於健康對照組為1345及1089 mU/mL，且對於顯色及LFA方法中之HAE個體，分別為275及163 mU/mL（表8）。該等測量之SEM及95%信賴區間提供於表8中。獲自兩種方法之所有HAE個體，包括在健康對照組範圍內具有C1-INH濃度之兩個HAE個體的C1-INH資料彼此相關（其中 R^2 為0.86）（圖9）。在顯色及LFA方法中，fC1INH經測量之正常對照組與HAE個體之間的平均比率分別為4.9及6.7。

【0124】 基於來自對照個體及患有HAE之個體之樣本的診斷效能之接收者操作曲線（ROC）為0.98，其指示藉由LFA測定之C1-IHN濃度在對照組與HAE個體之間經精確鑑別（圖7）。ROC曲線指示496 mU/mL之C1-INH分界點產生94%之靈敏度（真陽性率）及96%之特異性（假陽性率）（圖7）；假陰性及假陽性列於表9中。

【0125】 如表8及圖8-9中所示，將使用LFA獲得之結果與使用顯色分析藉由ELISA之分析進行比較。簡言之，顯色方法直接測量fC1-INH量，涉及C1s裂解合成受質以形成有色化合物，其中降低之顏色強度展現C1s酶活性之抑制。顯色分析之精確度、準確度、線性及定量的上限及下限均合格。C1-INH蛋白（2000 IU C1酯酶抑制子[人類]液體用於注射，Shire，Takeda公司）用於製備三個品質對照組以及具有介於1000-1.95 mU/mL範圍內的十個標準點之標準曲線。使用標準曲線之最高點及最低點作為錨點。簡言之，在室溫（RT）下在聚丙烯盤中將K3-EDTA血漿樣本及參考蛋白與重組人類補體組分C1s蛋白（R&D System）一起預培育30分鐘。所形成之C1-INH及C1s複合物以1:5稀釋於分析緩衝液中且與受質溶液（（具有苯甲硫醇酯基之合成受質，M-1300，Bachem）及5,5'-二硫代雙(2-硝基苯甲酸)（DTNB） #D-8000，Biosynth）混合，且使反應物在室溫下培育40分鐘。使用具有SoftMax Pro軟體之SpectraMax M5盤式讀取器在405 nm下記錄吸光度。

表8.比較顯色分析與LFA以測定fC1-INH濃度之結果

		使用顯色分析之 fC1INH 測量	使用 LFA 之 fC1INH 測量
正常對照組 血漿樣本	平均值	1345 mU/mL	1089 mU/mL
	n	50	50
	SEM	36 mU/mL	38 mU/mL
	95%信賴區間	1272 - 1418 mU/mL	1011 - 1166 mU/mL
HAE 血漿 樣本	平均值	275 mU/mL	163 mU/mL
	n	50	50
	SEM	39 mU/mL	32 mU/mL
	95%信賴區間	196 - 354 mU/mL	100 - 227 mU/mL

表9.顯示對照組及HAE樣本之假陽性及陰性之結果.

LFA fC1-INH 分界點= 496mU/mL		
	HAE 樣本	正常對照組
HAE 之 LFA 陽性	47	2
HAE 之 LFA 陰性	3	48

【0126】 綜合而言，此等結果表明藉由LFA及ELISA（稱為顯色分析）在患者血漿樣本中偵測到類似的fC1-INH濃度。因此，本文所描述之LFA及測試條帶可為基於來自患者之血漿樣本中之fC1-INH量，用於鑑別患有HAE之患者的有效工具。使用本文所描述之LFA獲得之結果與用於評定fC1-INH之顯色分析之結果相關。

【0127】 本文揭示之快速且靈敏的LFA方法及裝置可在醫師的辦公室實驗室中進行以便基於fC1INH量快速診斷HAE（例如I型及II型）。如此方法及裝置可引起由健康保險報銷之消耗品的成本低、定量結果中之可信度的程度高、醫師解釋資料容易及/或用於確認分析之需要程度低。在醫師的辦公室中診斷I型或II型HAE之如此快速分析可擴大HAE之篩檢且更快速地鑑別出新的HAE患者。目前，HAE之全球診斷率僅僅為40%；因此，未經診斷之患者具有高度未滿足之需求。常見裝置平台上之快速測試可用性可擴大HAE之辨識。另外，本文所揭示之fC1INH之快速測試可以及時方式在臨床配置中有助於監測HAE疾病進展或對療法之反應。

【0128】 參考文獻

1. Maurer, M.等人(2018) The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema - the 2017 revision and update. *World Allergy Organization Journal*
2. Aabom, A.等人(2017) Complement factor C4 activation in patients with hereditary angioedema. *Clinical Biochemistry* 50 (15), 816-821.
3. Bork, K.及Davis-Lorton, M. (2013) Overview of hereditary angioedema caused by C1-inhibitor deficiency: assessment and clinical management. *Eur Ann Allergy Clin*

Immunol 45

(1), 7-16.

4. Csuka, D.等人(2017) The role of the complement system in hereditary angioedema. *Mol*

Immunol 89, 59-68.

5. Li, H.H.等人(2015) Comparison of chromogenic and ELISA functional C1 inhibitor tests in diagnosing hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract* 3 (2), 200-5.

6. Campbell, R.L., Wagner, D.B.及O'Connell, J.P. (1987). Solid phase assay with visual readout. 美國專利第4,703,017號.

7. Rosenstein, R.W.及Bloomster, T.G. (1989). Solid phase assay employing capillary flow. 美國專利第4,855,240號.

8. May, K., Prior, M.E.及Richards, I. (1997). Capillary immunoassay and device therefore comprising mobilizable particulate labelled reagents. 美國專利第 5,622,871號.

9. O'Farrell, B. (2009). Evolution in Lateral Flow-Based Immunoassay Systems. 於: Wong, R.C. 及Tse, H.Y. (編). **Lateral Flow Immunoassay**. Humana Press New York (NY).

10. Zahedi R, Aulak KS, Eldering E, Davis AE 3rd (1996). Characterization of C1 inhibitor-Ta. A dysfunctional C1INH with deletion of lysine 251. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):24307-12

實施例3：競爭性結合分析展現用於偵測功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之側流分析（LFA）裝置之特異性。

【0129】藉由在不同競爭性結合蛋白存在下進行分析來檢查如本文所描述之用於測定fC1-INH濃度的側流分析（LFA）裝置之特異性。樣本含有100 mU/mL經純化之C1-INH。不將競爭蛋白添加至對照樣本中。測量測試線區域之強度，且計算各樣本自對照反應之信號之減少百分比。對於具有競爭蛋白之樣本，相較於對照樣本，測試線（TL）強度降低40%至60%（表10）。藉由添加經生物素標記之BSA的TL強度降低55%，這證實在分析中未偵測到不相關蛋白（表10）。對於未標記之FXIIa及未標記之抗體，TL強度分別降低61%及48%，這表明FXIIa及具有C1-INH之抗體對信號產生之特異性（表10）。

表10.特異性測試之結果

測試線	經標記之共軛物	經生物素化之結合蛋白	競爭蛋白	自 100 mU/mL 之信號	TL 信號之減少%
AbD2838 7	中性抗生物素蛋白-Eu	50 nM FXIIa	無	2400	N/A
			3 µM BSA-生物素	1080	55%
			200 nM FXIIa（無生物素）	930	61%
			900 nM AbD28387	1240	48%
AbD2838 4	中性抗生物素蛋白-Eu	50 nM FXIIa	無	3700	N/A
			900 nM AbD28384	2150	42%

【0130】使用已藉由加熱變性之C1-INH蛋白進一步測試偵測之特異性。藉由在40°C下加熱，TL強度未降低，但在53°C下加熱使TL強度降低至背景信號之強度（表11）。

表11.用經熱處理之C1-INH進行之特異性測試的結果

測試線	經標記之共軛物	經生物素化之結合蛋白	熱處理	自血漿中之 1000 mU/mL 的信號	自耗竭血漿之信號
AbD2838 7	中性抗生物素蛋白-Eu	50 nM FXIIa	無	5410	360
			40°C 持續 120 min	7110	360
			53°C 持續 120 min	370	420

【0131】 綜合而言，此等結果表明本文所描述之LFA及測試條帶對血漿樣本中的fC1-INH之偵測具有特異性。

實施例4：來自患者之血液樣本用以檢測LFA裝置中之功能性C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之用途.

【0132】 簡言之，藉由根據一般技術者將顯而易見之實驗室實踐進行手指針刺來收集全血樣本。在擦拭掉第一血液液滴之後，在手指上形成第二血液液滴。取樣環用於接觸第二血液液滴，用血液填充環（圖10A）。隨後將環添加至容器，諸如SampleTainer®瓶（圖10B）。在環觸碰瓶之底部的情況下，將瓶搭扣且擰扭以使軸之底部斷裂至瓶子中。最後，置換瓶之蓋子且振盪瓶以混合。可將全血樣本添加至用於分析之裝置中之任一者中。

實施例5：試劑之選擇

【0133】 選擇試劑用於本文所描述之方法及/或裝置。開發兩種初始偵測劑：採用與抗fC1-INH Fab共軛之鎢奈米粒子之一種偵測劑（圖11A）及使用與抗fC1-INH Fab共軛之紅色金奈米粒子之一種偵測劑（圖11B）。

【0134】 觀測到動態範圍之下端處之信號急劇減小，這表明系統達到最大信號。致力於降小關係之斜率，評價不同量之不同試劑。兩種試劑評定為測試系：以0.5 mg/mL之濃度印記之鏈黴抗生物素蛋白及鏈黴抗生物素蛋白之聚合型式（聚鏈黴抗生物素蛋白R）。發現與聚鏈黴抗生物素蛋白相比，鏈黴抗生物素蛋白具有較高信號，然而發現聚鏈黴抗生物素蛋白具有較高線性（圖12）。鎢共軛物自0.1%經調整至0.05%固體。培育步驟中所用之FXIIa與C1-INH/CINRYZE®之濃度自1 pmol/μL降至0.5 pmol/μL，以降低分析之動態範圍。此產生具有可偵測範圍內之信號的分析。

【0135】 亦評定測試線之不同試劑。簡言之，產生三個不同測試線：將人類經生物素化之FXIIa（B-HFXIIa）與鏈黴抗生物素蛋白混合，將B-HFXIIa與聚鏈黴抗生物素蛋白混合，且單獨HFXIIa（未經生物素化）。使用HFXIIa提供陽性、但低信號，而B-HFXIIa及鏈黴抗生物素蛋白與B-HPFXIIa及聚鏈黴抗生物素蛋白不具有任何明顯的陽性信號（圖13）。

【0136】 另外，亦評定用於本文所描述之方法中的抗C1-INH抗體。在四種濃度（1200 mU/mL、600 mU/mL、100 mU/mL及9 mU/mL）下對四種鎗共軛物（抗C1-INH Fab以及來自Sino Biological公司之抗C1-INH抗體RP01、RP02、MM03及MM06抗體）進行評價（圖14）。相較於Fab共軛物，使用抗體RP01、RP02、MM03及MM06中之每一者獲得之信號增強。選擇多株抗體RP02用於進一步分析。

【0137】 亦評價緩衝液條件。舉例而言，具有無機緩衝劑（IBA）之緩衝液或具有有機緩衝劑（OBA）之緩衝液各自在7.0-9.5之不同pH下製備。具有IBA之緩衝液在pH範圍之較高端處（pH 9.5）表現得較好（例如信號較高），而具有OBA之緩衝液在生理pH範圍（約7-7.5）下表現得較好（例如信號較高）（圖15）。

【0138】 最後，亦評價與抗C1-INH結合劑共軛之可偵測試劑。特定言之，使用鎗共軛物或紅色金共軛物評定抗體RP02且與抗C1-INH Fab相比較。Fab共軛物不產生陽性信號，而具有紅色金共軛物之RP02抗體產生陽性信號（圖16）。

其他實施方式

【0139】 本說明書中揭示之所有特徵可以任何組合形式組合。本說明書中揭示之各特徵可經用於相同、等效或類似目的之替代性特徵置換。因此，除非另外明確說明，否則所揭示之各特徵僅為一系列通用等效或類似特徵之一個實例。根據以上描述，熟習此項技術者可容易確定本文之揭示內容之基本特徵，

且在不背離其精神及範疇之情況下可對本文之揭示內容作出各種改變及修改以使其適應多種用途及條件。因此，其他實施方式亦屬於申請專利範圍內。

等效物及範疇

【0140】 熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗即可確定本文所描述之本文之揭示內容特定實施方式的許多等效物。本文之揭示內容之範疇不意欲受限於以上描述，而實際上如隨附申請專利範圍中所闡述。

【0141】 在申請專利範圍中，除非相反地指示或另外自上下文顯而易見，否則諸如「一 (a/an)」及「該」之冠詞可意謂一或大於一。除非相反地指示或另外自上下文中顯而易見，否則若一個、大於一個或所有群成員存在於、用於給定產物或方法中或以其他方式與給定產物或方法相關，則在該群組的一或多個成員之間包括「或」的申請專利範圍或描述視為滿足。本文之揭示內容包括群組中恰好一個成員存在於、用於給定產物或方法中或以其他方式與給定產物或方法相關之實施方式。本文之揭示內容包括大於一個或所有群組成員存在於、用於給定產物或方法中或以其他方式與給定產物或方法相關之實施方式。

【0142】 此外，本文之揭示內容涵蓋所有變化、組合及排列，其中將來自所列的申請專利範圍中之一或多者之一或多個限制、要素、條款及描述性術語引入另一申請專利範圍中。舉例而言，依附於另一申請專利範圍之任何申請專利範圍可經修改以包括在依附於同一基本申請專利範圍之任何其他申請專利範圍中可見的一或多個限制。在要素以清單形式，例如呈馬庫什 (Markush) 群組形式呈現下，亦揭示要素之各子組，且可自該群組移除任何要素。應理解，一般而言，當本文之揭示內容或本文之揭示內容之方面稱為包含特定要素及/或特徵時，本文之揭示內容之某些實施方式或本文之揭示內容之方面由如此要素及/或特徵組成或基本上由其組成。出於簡單之目的，彼等實施方式尚未具體地以

詞語闡述在本文中。亦應注意，術語「包含」及「含有」意欲係開放性的且允許包括額外要素或步驟。當給出範圍時，包括端點。此外，除非另外指示或另外從上下文及一般技術者的理解顯而易見，否則表示為範圍之值可在本文之揭示內容之不同實施方式中採用所述範圍內之任何特定值或子範圍，除非上下文另外明確規定，否則達到該範圍下限之單位的十分之一。

【0143】 本申請案提及各種頒予的專利、公開的專利申請案、期刊文章及其他出版物，以上所有者均以引用的方式併入本文中。若任何併入之參考文獻與本說明書之間存在衝突，則應以本說明書為準。另外，本文之揭示內容之屬於先前技術之任何特定實施方式可明確地自申請專利範圍中之任何一或多項排除。因為如此實施方式被認為是一般熟習此項技術者所已知的，所以可對其進行排除，即使未在本文中明確地闡述該排除。本文之揭示內容之任何特定實施方式可出於任何原因自任何申請專利範圍排除，無論是否與先前技術之存在相關。

【0144】 熟習此項技術者僅使用常規實驗將認識到或能夠確定本文所描述之特定實施方式之許多等效物。本文所描述之本發明實施方式之範疇不意欲受限於以上描述，而實際上如隨附申請專利範圍中所闡述。一般技術者將瞭解，可在不脫離如以下申請專利範圍所定義之本文之揭示內容之精神或範圍的情況下對本說明書進行各種改變及修改。

【符號說明】

【0145】

100: 側流分析 (LFA) 裝置

200: 共軛物墊

210: 第一區域

220: 第二區域

230: 第三區域

240: 第四區域

250: 第五區域

300: 膜

400: 吸收墊

500: 支撐構件

600: 外殼

610: 緩衝液口

620: 取樣口

630: 測試窗口

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種用於偵測及/或定量功能性 C1-酯酶抑制子 (fC1-INH) 之裝置，該裝置包含：

(i) 共軛物墊，其包含第一區域及第二區域，其中該第一區域包含第一試劑，該第二區域包含第二試劑，及

(ii) 膜，其與該共軛物墊連通，其中該膜包含第三區域，該第三區域包含第三試劑，

其中該第一試劑為功能性 C1 抑制子 (fC1-INH) 結合劑或 C1 抑制子 (C1-INH) 結合劑，且該第二試劑是 fC1-INH 結合劑或 C1-INH 結合劑，且該第一試劑和該第二試劑、彼此不同；

其中，該第三試劑為能夠與銜接劑 (docking agent) 結合的捕捉劑；

其中該 fC1-INH 結合劑、該 C1-INH 結合劑中之一者與可偵測標記共軛，且該 fC1-INH 結合劑及該 C1-INH 結合劑中之另一者與該銜接劑共軛，該可偵測標記及該銜接劑分別與不同結合劑共軛；且

其中該共軛物墊進一步包含用於置放生物樣本之第四區域和用於置放緩衝液的第五區域，該緩衝液以該第一區域、該第二區域、及該第三區域之次序流動穿過該裝置。

【請求項2】 如請求項 1 之裝置，其中該第一試劑、該第二試劑、及該第三試劑分別為該 C1-INH 結合劑、該 fC1-INH 結合劑、及該捕捉劑，或其中該第一試劑、該第二試劑、及該第三試劑分別為該 fC1-INH 結合劑、該 C1-INH 結合劑、及該捕捉劑。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該第一試劑與該可偵測標記共軛，該第二試劑與該銜接劑共軛，或其中該第一試劑與該銜接劑共軛，該第二試劑與該可偵測標記共軛。

【請求項4】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該 fC1-INH 結合劑為因子 XII 之活性形式 (FXIIa)。

【請求項5】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該 C1-INH 結合劑為結合 C1-INH 之抗體。

【請求項6】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該銜接劑及該捕捉劑為受體-配位體對之成員。

【請求項7】 如請求項 6 之裝置，其中該受體-配位體對包含生物素及抗生物素蛋白。

【請求項8】 如請求項 7 之裝置，其中該銜接劑為生物素且該捕捉劑為抗生物素蛋白。

【請求項9】 如請求項 8 之裝置，其中該抗生物素蛋白為鏈黴抗生物素蛋白 (streptavidin) 或聚鏈黴抗生物素蛋白。

【請求項10】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該可偵測標記係選自由以下者組成之群：鎳、膠體金、藻紅素、螢光素、玫瑰紅 (rhodamine)、綠色螢光蛋白、量子點、及發色團。

【請求項11】 如請求項 10 之裝置，其中該可偵測標記為鎳。

【請求項12】 如請求項 10 之裝置，其中該可偵測標記為膠體金。

【請求項13】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該可偵測標記連接至乳膠粒子。

【請求項14】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該第四區域與該第二區域重疊。

【請求項15】 如請求項 1 或 2 之裝置，其中該第一試劑為位於該第一區域之該 C1-INH 結合劑，該第二試劑為位於該第二區域之該 fC1-INH 結合劑，且該第三試劑為位於該第三區域之該捕捉劑。

【請求項16】 如請求項 15 之裝置，其中該 C1-INH 結合劑為與該可偵測標記共軛之結合至該 C1-INH 的抗體，該 fC1-INH 結合劑為與該銜接劑共軛之 FXIIa，其中該銜接劑為生物素，且該捕捉劑為抗生物素蛋白。

【請求項17】 如請求項 16 之裝置，其中該抗生物素蛋白為鏈黴抗生物素蛋白或聚鏈黴抗生物素蛋白。

【請求項18】 如請求項 1 或 2 之裝置，其進一步包含與該膜連通之吸收墊，其中該吸收墊及該共軛物墊藉由該膜分隔開。

【請求項19】 如請求項 1 或 2 之裝置，其進一步包含支撐構件，該共軛物墊、該膜、及/或吸收墊安裝在該支撐構件上。

【請求項20】 如請求項 1 或 2 之裝置，其進一步包含外殼。

【請求項21】 如請求項 20 之裝置，其中該外殼包含形成緩衝液口之第一開口、形成取樣口之第二開口、及形成測試窗口之第三開口。

【請求項22】 如請求項 21 之裝置，其中該取樣口位於該緩衝液口與該測試窗口之間。

【請求項23】 如請求項 21 之裝置，其中該緩衝液口與該第一區域對準，該 C1-INH 結合劑位於該第一區域上。

【請求項24】 如請求項 21 之裝置，其中該取樣口與該第二區域對準，該 fC1-INH 結合劑位於該第二區域上。

【請求項25】 如請求項 21 之裝置，其中該測試窗口與該第三區域對準，該捕捉劑位於該第三區域上。

【請求項26】 一種用於偵測及/或定量樣本中之功能性 C1-酯酶抑制子 (fC1-INH) 之方法，該方法包含：

- (i) 將該生物樣本置放於如請求項 21 至 25 中任一項之裝置之該取樣口中，
- (ii) 將緩衝液置放於該裝置中的該緩衝液口中，其中該緩衝液以該第一區域

往該第三區域的方向流動；

(iii) 偵測該裝置中之該測試窗口處的信號，及

(iv) 基於該測試窗口處的該信號之存在或強度測定該樣本中 fC1-INH 之存在或測量該生物樣本中 fC1-INH 之量。

【請求項27】 如請求項 26 之方法，其中步驟 (ii) 在步驟 (i) 之後至少 5 分鐘之後進行，且其中與該取樣口對準的該第二區域包含該 fC1-INH 結合劑。

【請求項28】 如請求項 26 之方法，其中該樣本為獲自個體之生物樣本。

【請求項29】 如請求項 28 之方法，其中該生物樣本為血清樣本、血漿樣本、或血液樣本。

【請求項30】 如請求項 28 或 29 之方法，其中該個體為疑似患有 fC1-INH 缺乏介導之病症或處於該病症風險下的人類患者。

【請求項31】 如請求項 30 之方法，其中該 fC1-INH 缺乏介導之病症係選自由以下者組成之群：遺傳性血管性水腫 (HAE)、獲得性血管性水腫 (AAE)、及 C1-INH 相關免疫疾病。

【請求項32】 如請求項 31 之方法，其中該個體具有 HAE 之症狀。

【請求項33】 如請求項 31 之方法，其中該 HAE 為 I 型 HAE 或 II 型 HAE。

【請求項34】 如請求項 31 之方法，其中該個體不具有 HAE 之症狀、不具有 HAE 之症狀之病史、或不具有 HAE 之病史。

【請求項35】 一種用於偵測及/或定量樣本中之功能性 C1-酯酶抑制子 (fC1-INH) 之方法，該方法包含：

(i) 使樣本與 fC1-INH 結合劑和 C1-INH 結合劑接觸以形成複合物，其中該 fC1-INH 結合劑及該 C1-INH 結合劑中之一者與銜接劑共軛，且其中該 fC1-INH 結合劑和該 C1-INH 結合劑中之一者與可偵測標記共軛，且該可偵測標記及該銜接劑分別與不同結合劑共軛；

將步驟 (i) 之該複合物與捕捉劑接觸，其中該捕捉劑與該銜接劑結合；及

(ii) 偵測自該複合物中之該可偵測標記釋放之信號；其中自該複合物中之該可偵測標記釋放之該信號的存在指示該樣本中存在 fC1-INH。

【請求項36】 如請求項 35 之方法，其中步驟 (i) 係藉由以下進行：將該樣本與該 fC1-INH 結合劑一起培育至少 5 分鐘。

【請求項37】 如請求項 35 或 36 之方法，其中該 fC1-INH 結合劑為因子 XII 之活性形式 (FXIIa)。

【請求項38】 如請求項 35 或 36 之方法，其中該銜接劑及該捕捉劑為受體-配位體對之成員。

【請求項39】 如請求項 38 之方法，其中該銜接劑為生物素且該捕捉劑為抗生物素蛋白；或該銜接劑為抗生物素蛋白且該捕捉劑為生物素。

【請求項40】 如請求項 39 之方法，其中該抗生物素蛋白為鏈黴抗生物素蛋白或聚鏈黴抗生物素蛋白。

【請求項41】 如請求項 35 或 36 之方法，其中該 C1-INH 結合劑為結合 C1-INH 之抗體。

【請求項42】 如請求項 35 或 36 之方法，其中該可偵測標記係選自由以下者組成之群：鎔、膠體金、藻紅素、螢光素、玫瑰紅、綠色螢光蛋白、量子點、及發色團。

【請求項43】 如請求項 42 之方法，其中該可偵測標記為鎔。

【請求項44】 如請求項 42 之方法，其中該可偵測標記為膠體金。

【請求項45】 如請求項 35 或 36 之方法，其中該可偵測標記連接至乳膠粒子。

【請求項46】 如請求項 35 或 36 之方法，其中該 fC1-INH 結合劑為與生物素共軛的因子 XII 之活性形式 (FXIIa)，其中該 C1-INH 結合劑為結合 C1-INH 之抗體，該抗體與該可偵測標記共軛，且其中該捕捉劑為鏈黴抗生物素蛋白。

【請求項47】 如請求項 46 之方法，其中該步驟 (i) 藉由以下者進行：

- (a) 將該樣本與該 fC1-INH 結合劑一起培育至少 5 分鐘以形成第一複合物，
- (b) 使該第一複合物與該 C1-INH 結合劑接觸以形成第二複合物，及其中該步驟 (ii) 包含使該第二複合物與該捕捉劑接觸以形成該複合物，且其中該捕捉劑固定於支撐構件上。

【請求項48】 如請求項 35 之方法，其中該樣本為獲自個體之生物樣本。

【請求項49】 如請求項 48 之方法，其中該生物樣本為血清樣本、血漿樣本、或血液樣本。

【請求項50】 如請求項 48 之方法，其中該個體為疑似患有 fC1-INH 缺乏介導之病症或處於該病症風險下的人類患者。

【請求項51】 如請求項 50 之方法，其中該 fC1-INH 缺乏介導之病症係選自由以下者組成之群：遺傳性血管性水腫 (HAE)、獲得性血管性水腫 (AAE)、及 C1-INH 相關免疫疾病。

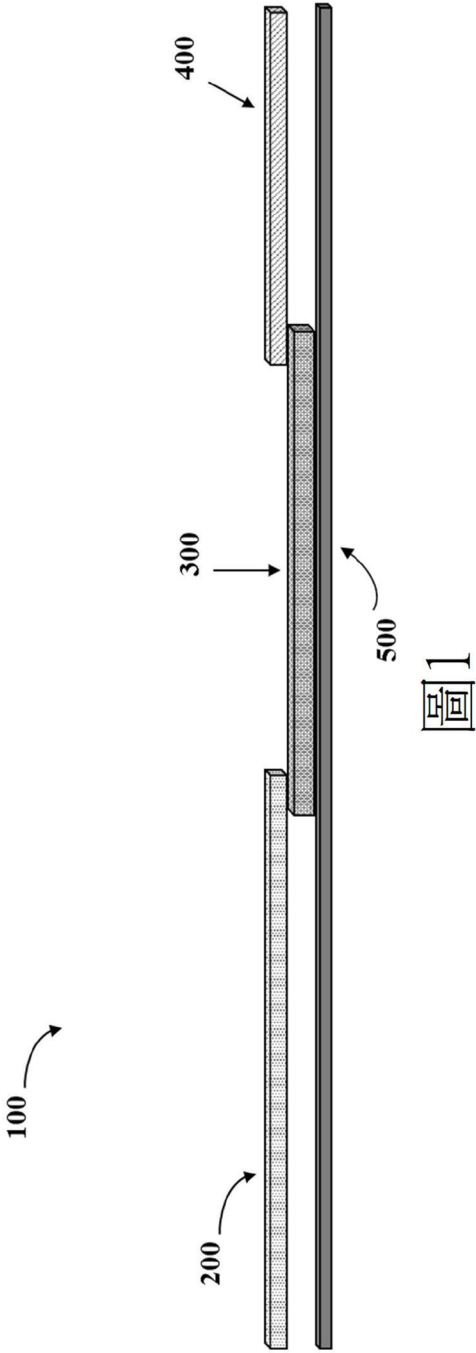
【請求項52】 如請求項 51 之方法，其中該個體具有 HAE 症狀。

【請求項53】 如請求項 51 之方法，其中該 HAE 為 I 型 HAE 或 II 型 HAE。

【請求項54】 如請求項 48 或 49 之方法，其中該個體對抗組織胺療法、皮質類固醇療法、或兩者具有抗性。

【請求項55】 如請求項 50 之方法，其中該個體不具有 HAE 之症狀、不具有 HAE 之症狀之病史、或不具有 HAE 之病史。

【發明圖式】



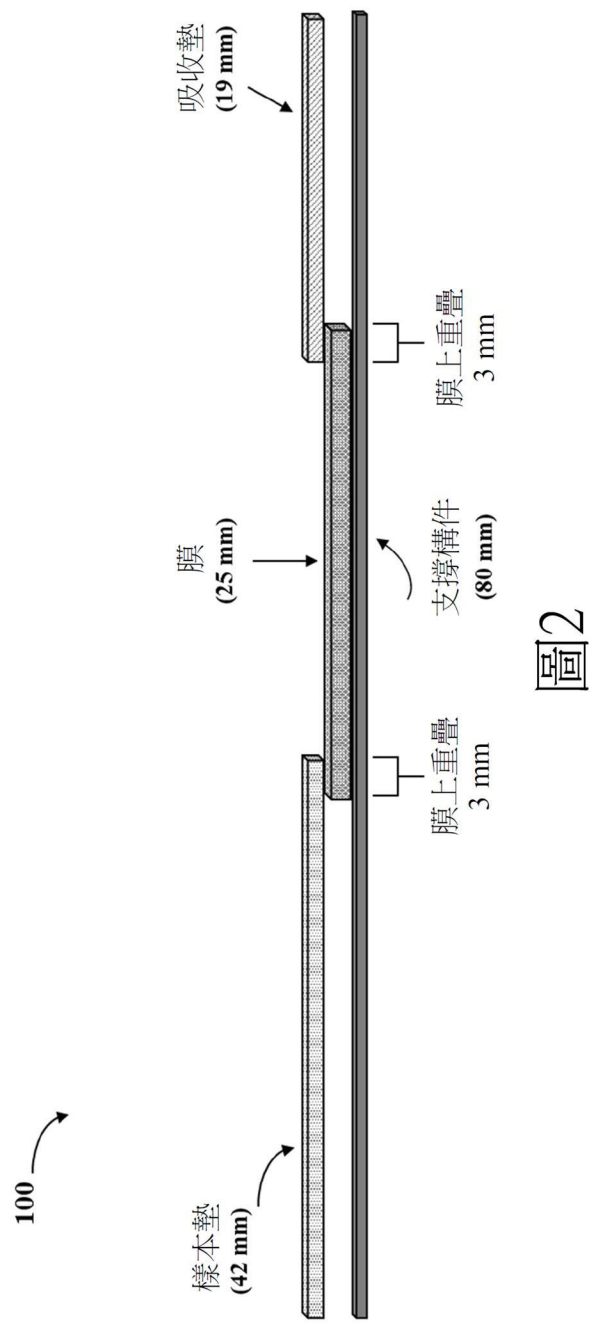


圖2

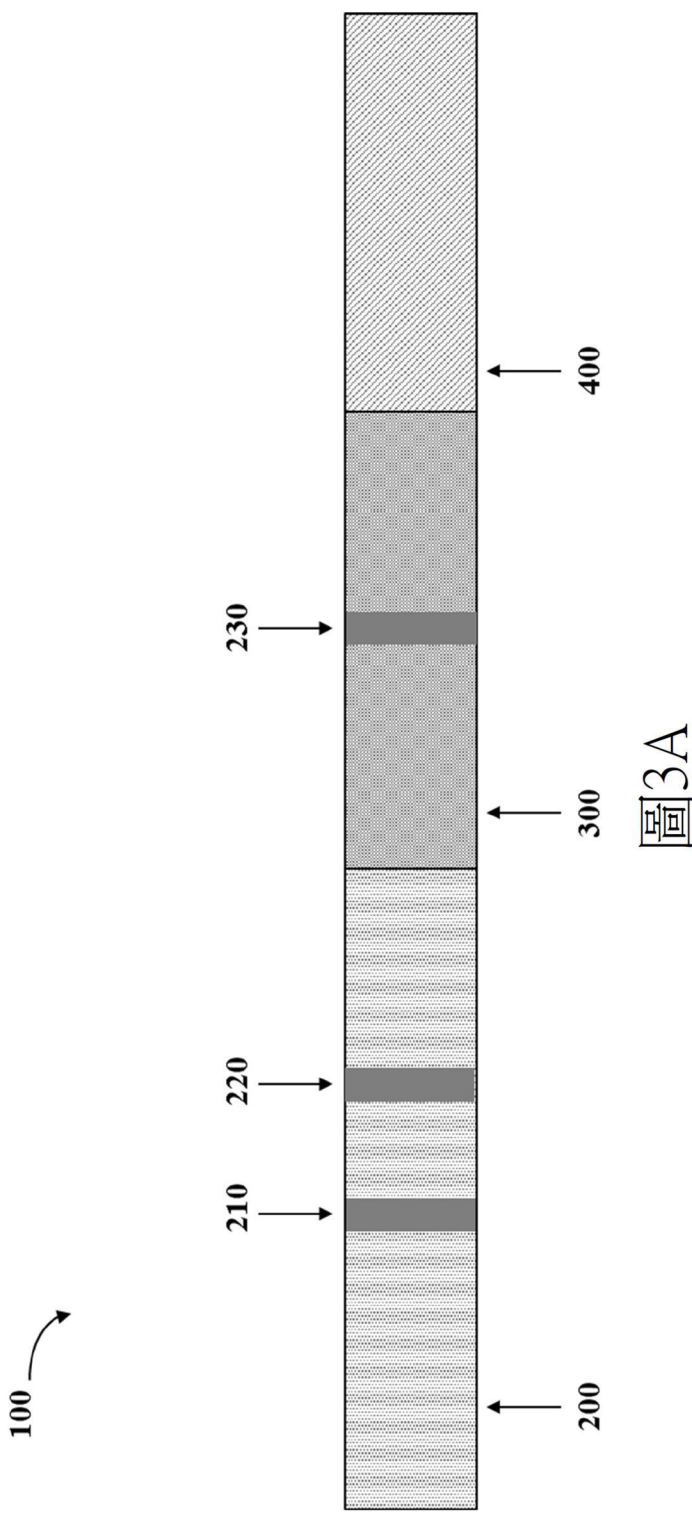
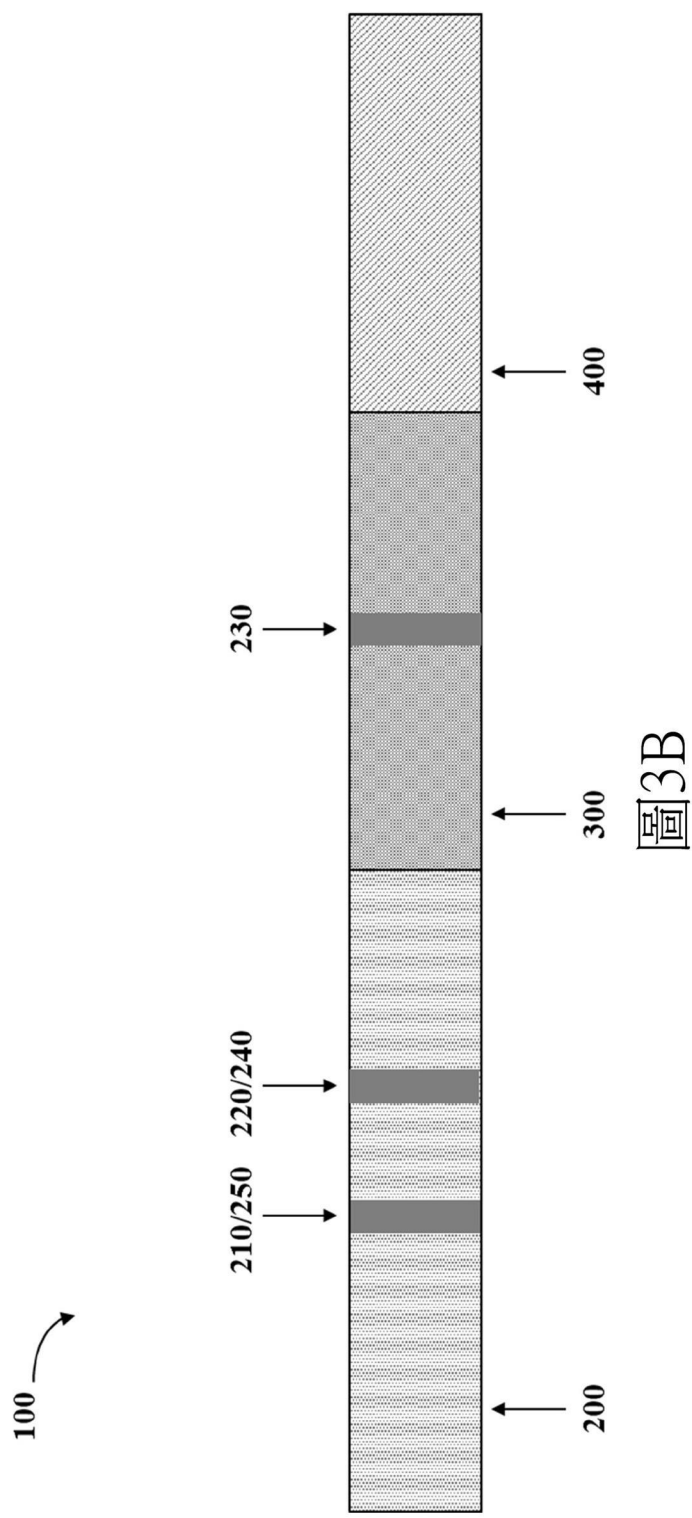


圖3A



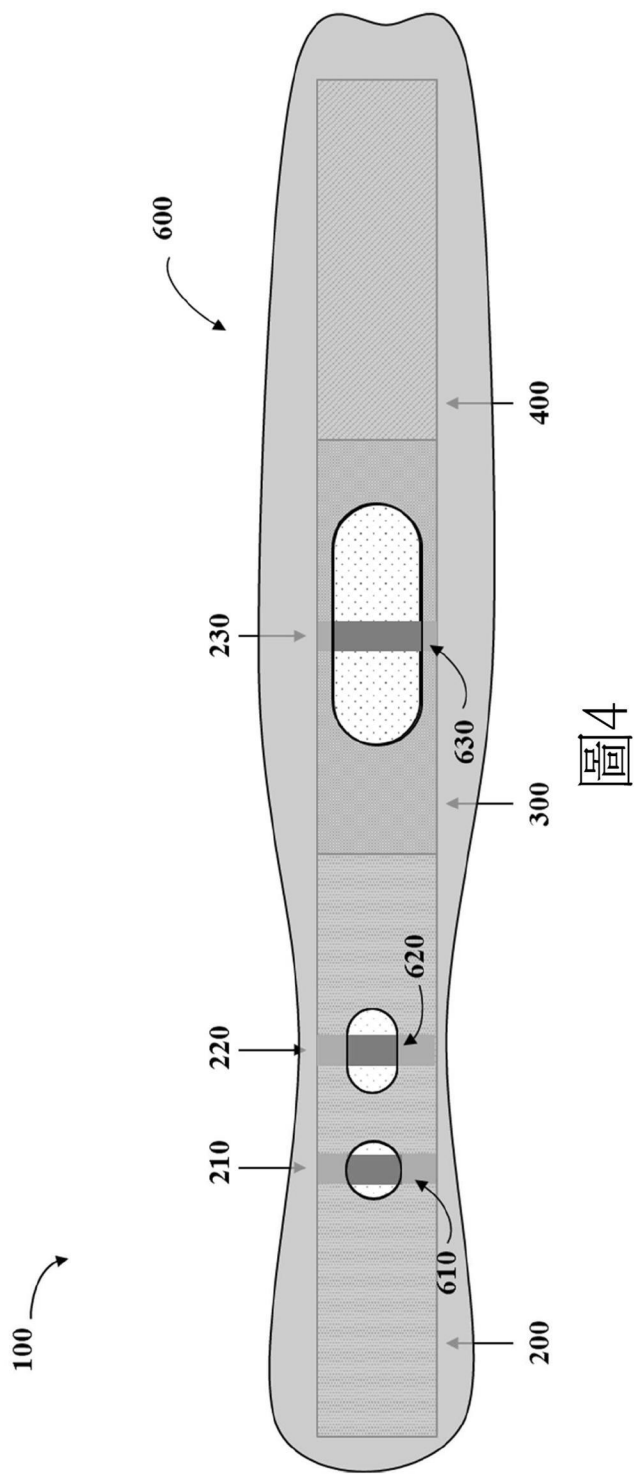


圖4

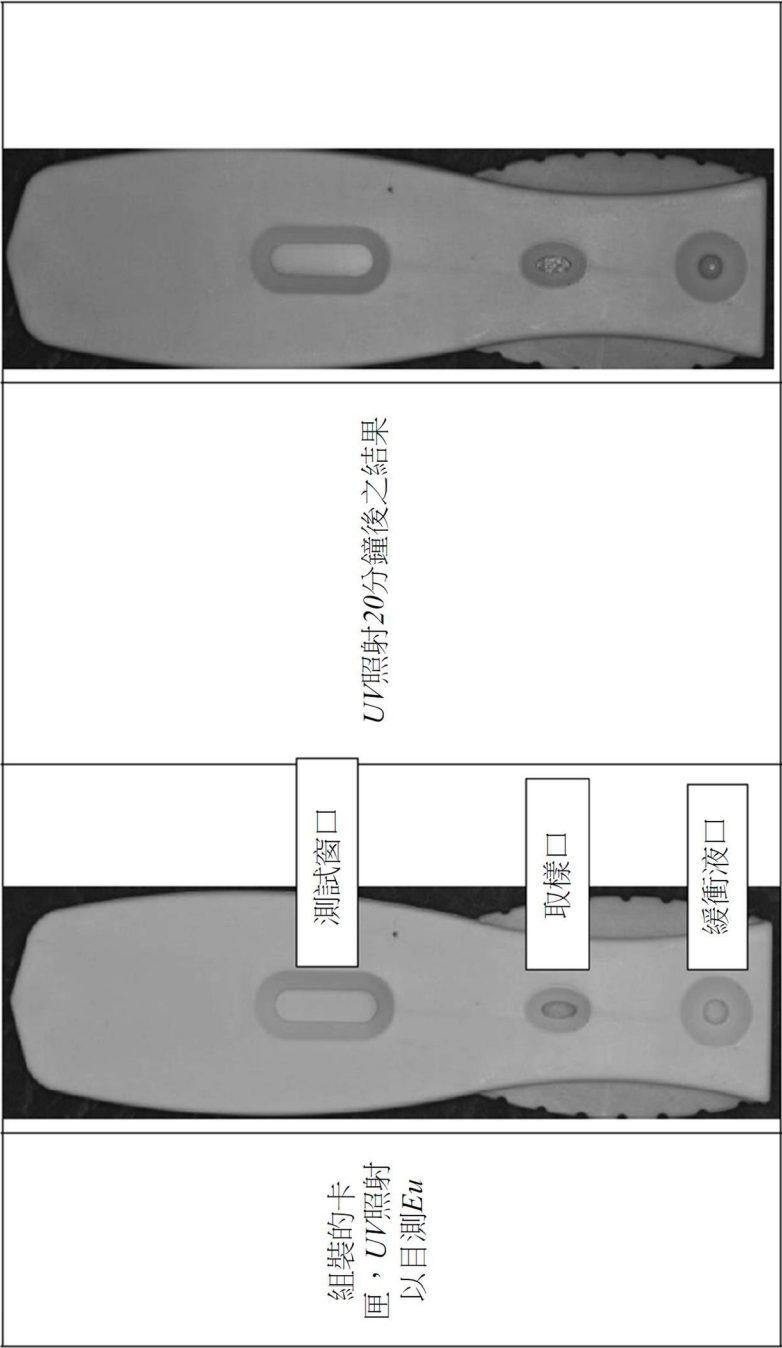


圖5

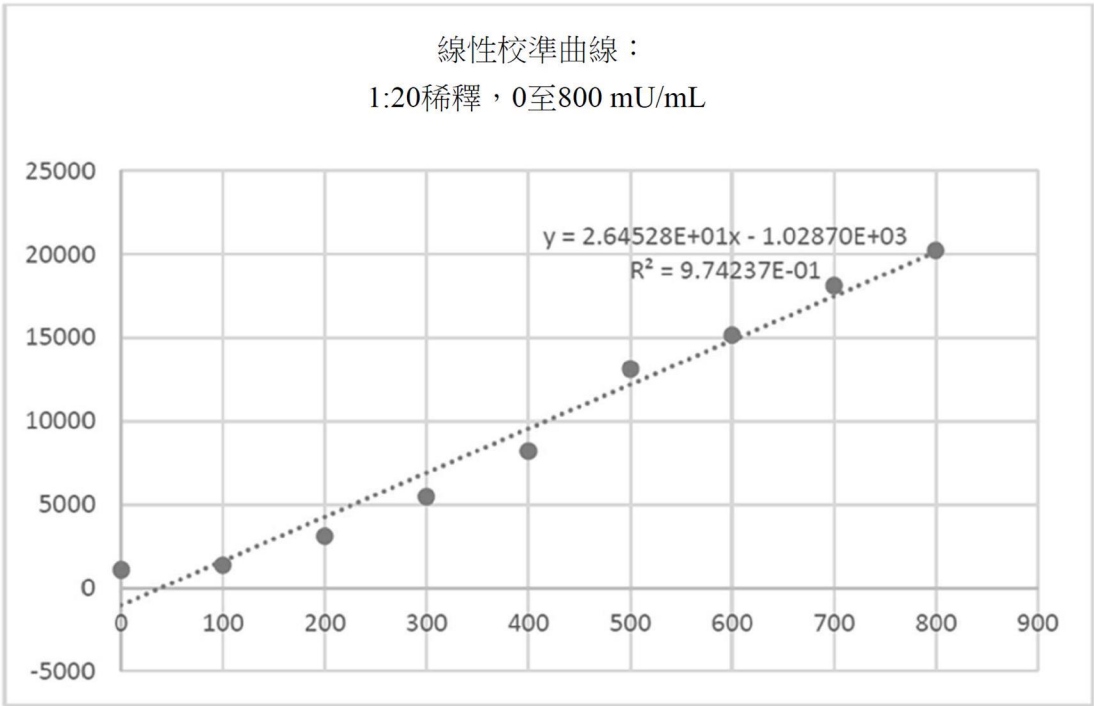


圖6

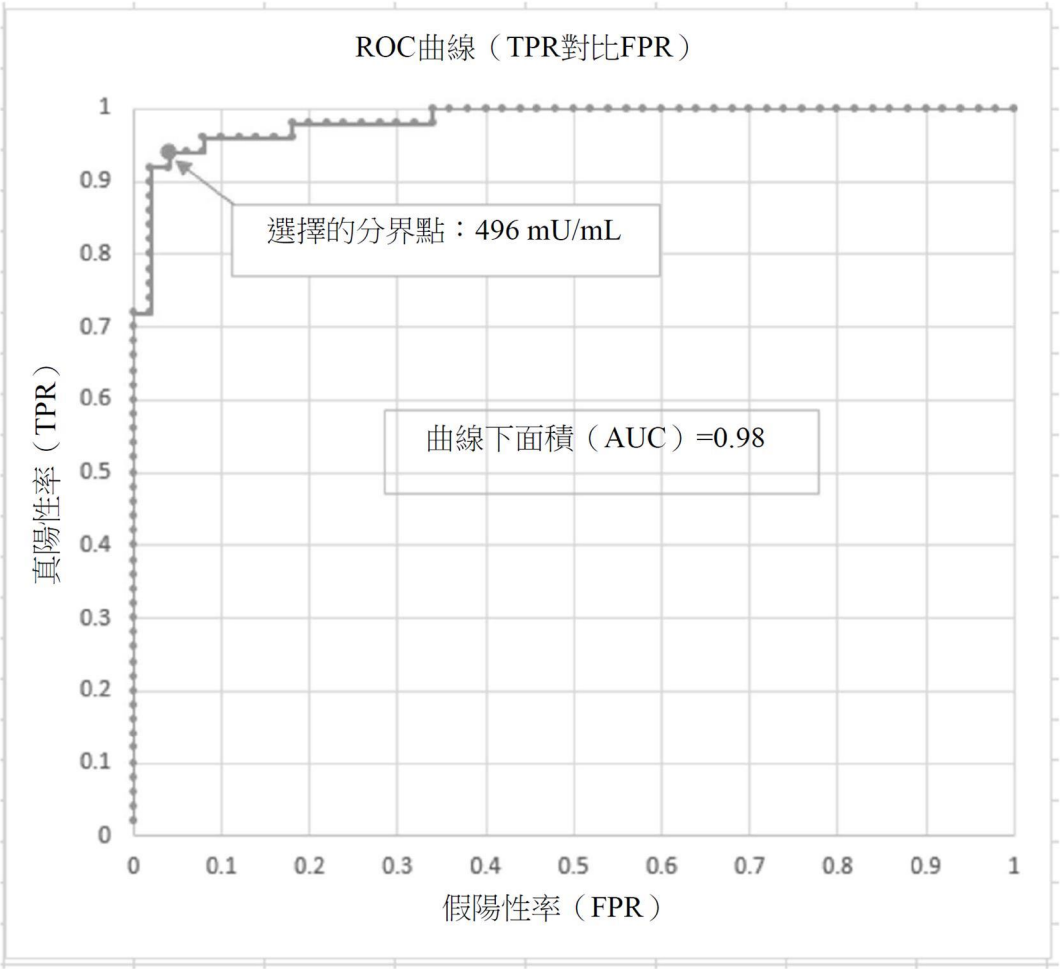


圖7

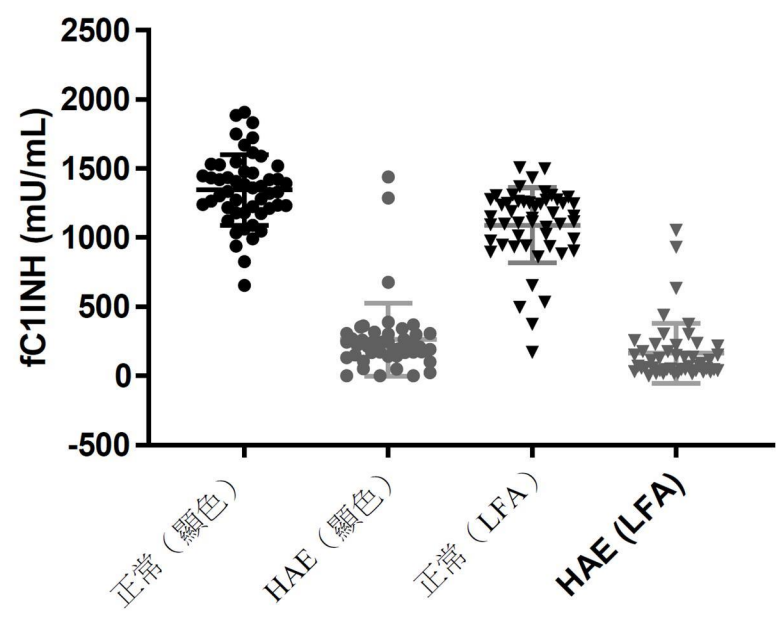


圖8

HAE樣本：顯色對比LFA相關性

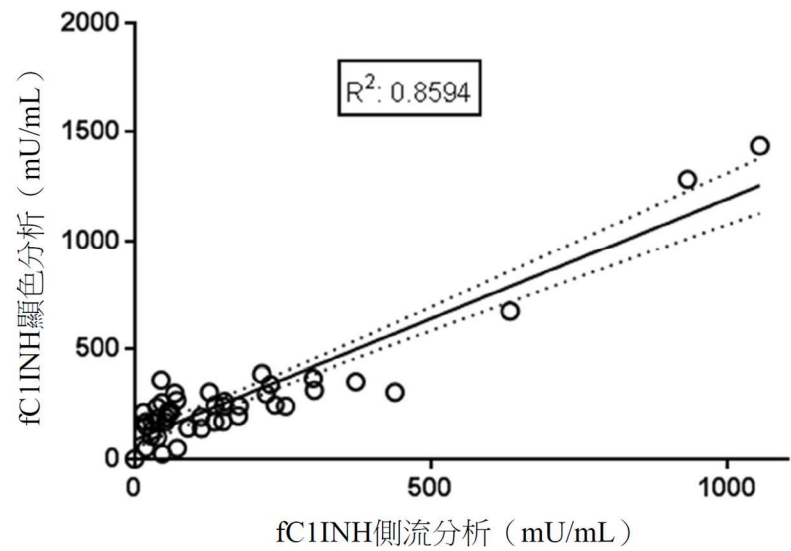
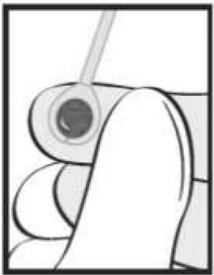


圖9



取樣環必須填充有血液

圖10A



圖10B

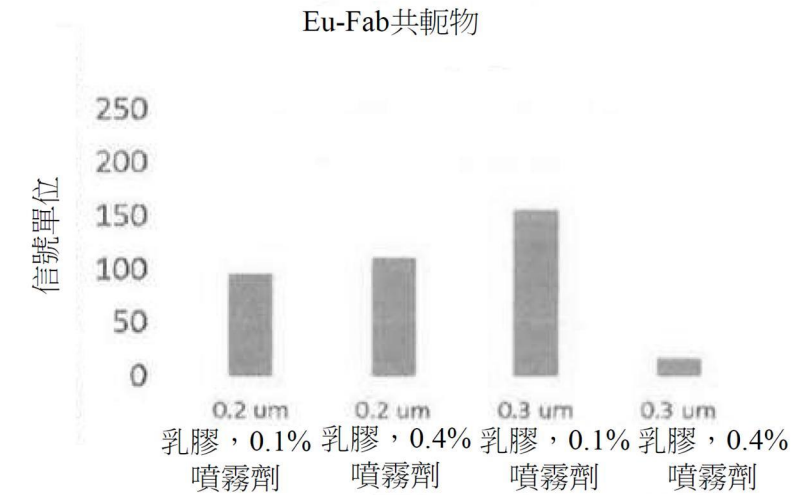


圖11A

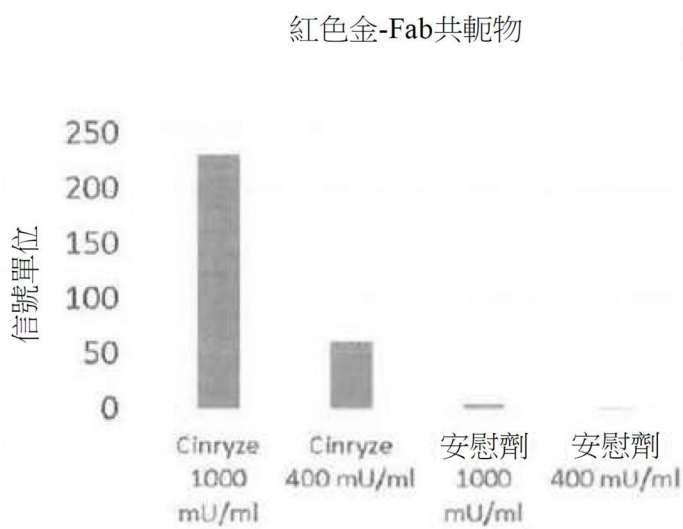


圖11B

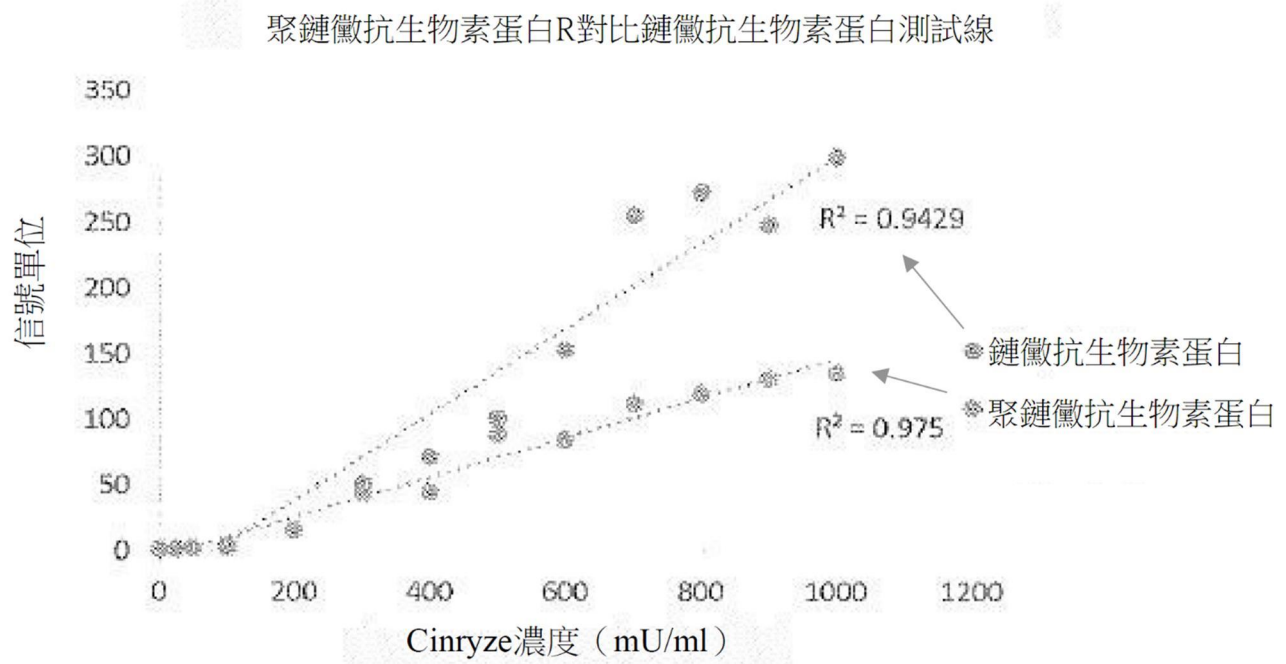


圖12

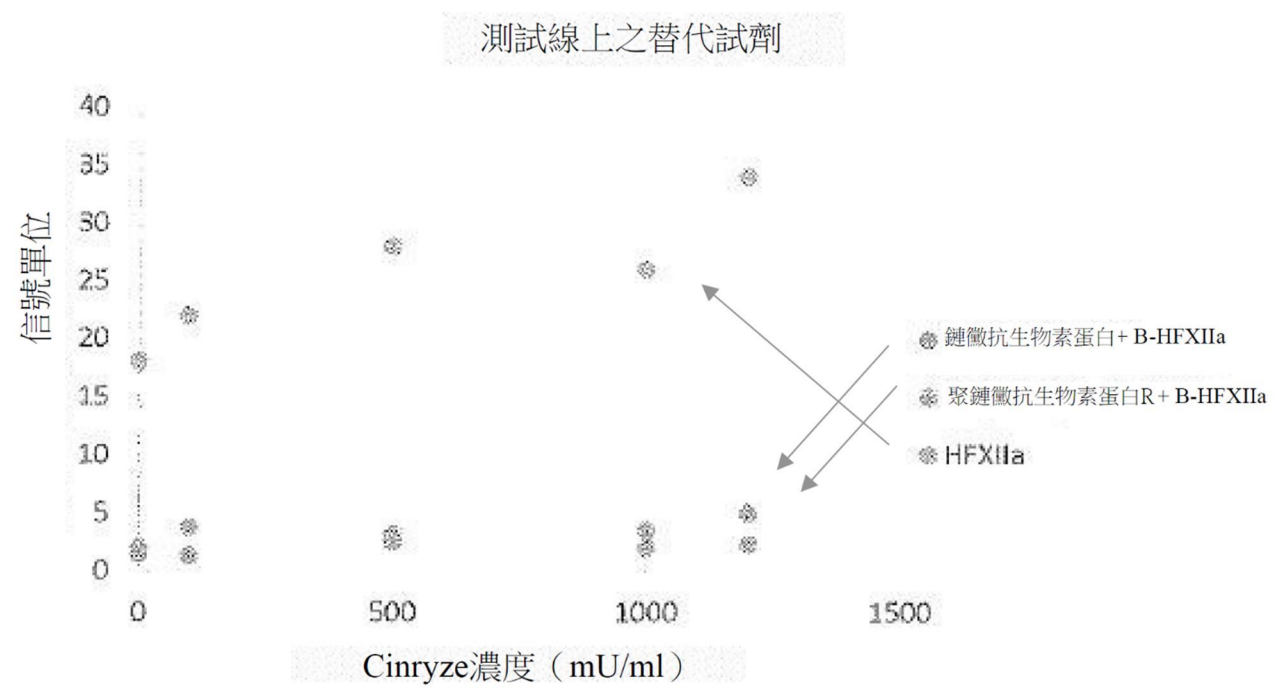


圖13

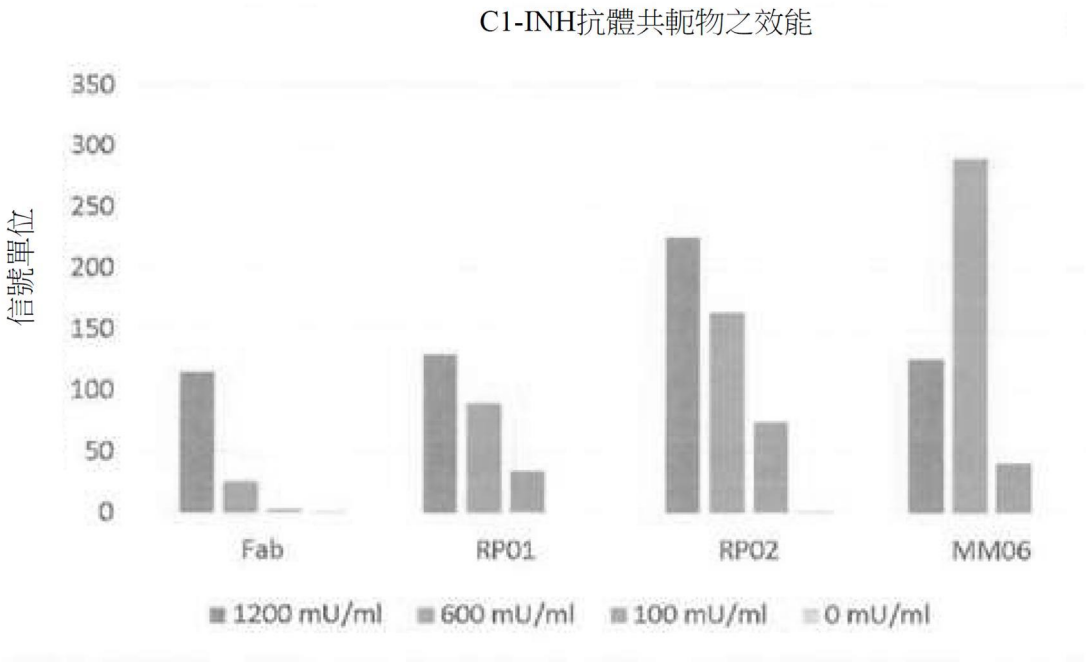


圖14

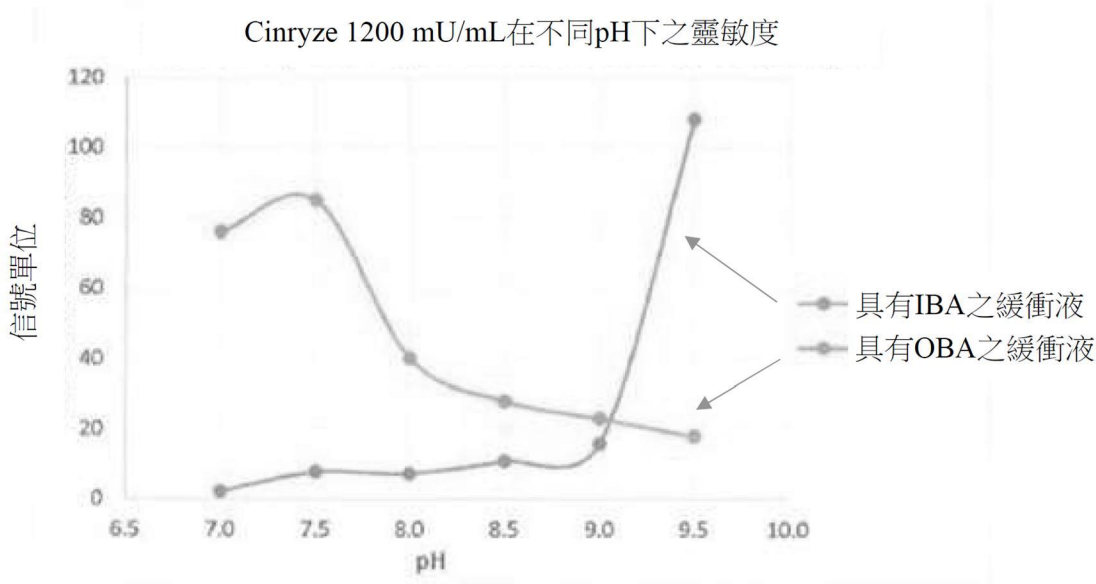


圖15

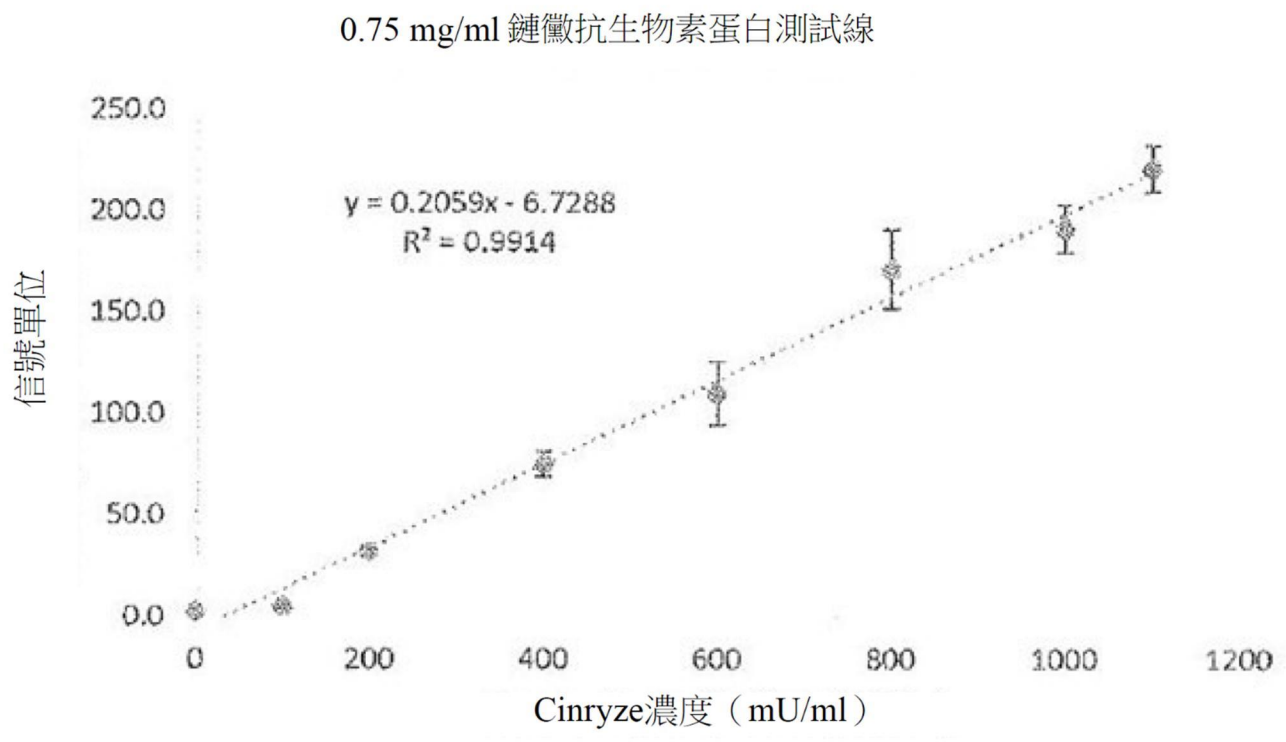


圖16

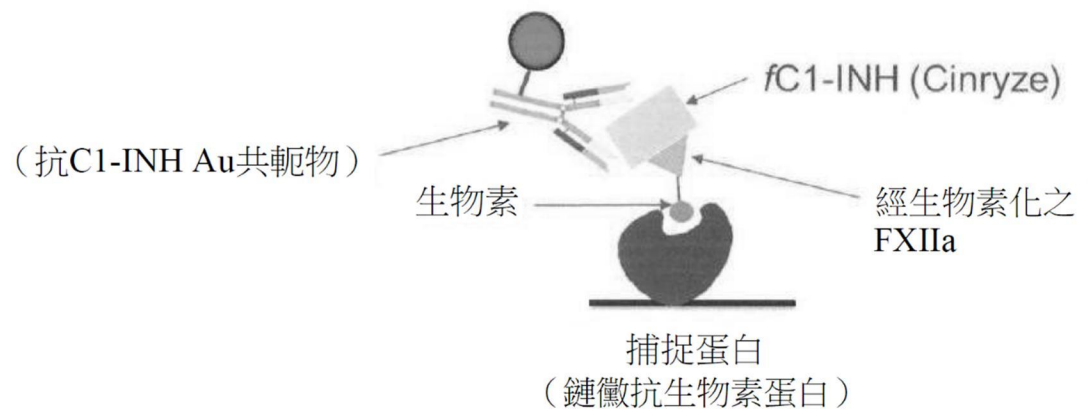


圖17