



(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 I881973 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：109112617

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 15 日

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

A61P1/00 (2006.01)

A61P13/00 (2006.01)

A61P17/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/04/16 美國

62/834,461

2019/11/07 美國

62/932,011

(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)；賴永權 LAI, YONGQUAN (CN)；吳 江 WU, JIANG (US)；張 國東 ZHANG, GUODONG (US)；周 季維 ZHOU, ZHIWEI (US)

(74)代理人：楊長峯

(56)參考文獻：

US 2015/0362492A1

期刊 Martin N.J., et al., "Dried Blood Spot Proteomics: Surface Extraction of Endogenous Proteins Coupled with Automated Sample Preparation and Mass Spectrometry Analysis", J. Am. Soc. Mass Spectrom., Vol. 24(8), 2013, page 1242-1249.

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：9 共 53 頁

(54)名稱

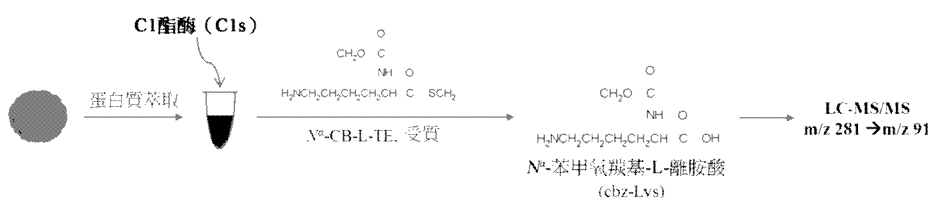
定量功能性 C1 酯酶抑制子 (fC1-INH) 之方法

(57)摘要

本文提供定量來自乾燥血液樣點之 fC1-INH 之方法。如此方法可包含將血液樣本點樣於支撐構件上且乾燥、自該乾燥血液樣本萃取蛋白質及量測所萃取蛋白質中的 fC1-INH 之量。

Methods for quantitation of fC1-INH from dried blood spot are provided herein. Such methods may comprise spotting and drying a blood sample on a support member, extracting protein from the dried blood sample and measuring the level of fC1-INH in the extracted proteins.

指定代表圖：



符號簡單說明：

無

圖 1



I881973

**【發明摘要】****【中文發明名稱】** 定量功能性 C1 酯酶抑制子 (FC1-INH) 之方法**【英文發明名稱】** METHODS FOR QUANTITATION OF FUNCTIONAL C1  
ESTERASE INHIBITOR (FC1-INH)**【中文】**

本文提供定量來自乾燥血液樣點之 fC1-INH 之方法。如此方法可包含將血液樣本點樣於支撐構件上且乾燥、自該乾燥血液樣本萃取蛋白質及量測所萃取蛋白質中的 fC1-INH 之量。

**【英文】**

Methods for quantitation of fC1-INH from dried blood spot are provided herein. Such methods may comprise spotting and drying a blood sample on a support member, extracting protein from the dried blood sample and measuring the level of fC1-INH in the extracted proteins.

**【指定代表圖】** 圖 1**【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】 定量功能性 C1 酯酶抑制子 (FC1-INH) 之方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR QUANTITATION OF FUNCTIONAL C1  
ESTERASE INHIBITOR (FC1-INH)

### 【技術領域】

【0001】 本申請案係關於測定樣本中功能性 C1-酯酶抑制子 (functional C1-esterase inhibitor, fC1-INH) 之量之方法。

### 相關申請案

【0002】 本申請案根據 35 U.S.C. § 119(e)主張於 2019 年 4 月 16 日申請之美國臨時申請案第 62/834,461 號及於 2019 年 11 月 7 日申請之美國臨時申請案第 62/932,011 號的權益；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】 遺傳性血管水腫 (hereditary angioedema, HAE) 為由遺傳性血漿蛋白質 C1 酯酶抑制子 (簡言之 C1 抑制子, C1-INH) 之缺乏或功能異常所引起之罕見的常染色體顯性遺傳疾病。HAE 之特徵在於血管性水腫之反覆性發作, 其通常涉及面部、表皮、腸道及/或呼吸道。症狀可見於其他疾病中, 這使得對 HAE 之診斷複雜化。HAE 主要可劃分成兩種類型。I 型之特徵在於低量之 C1-INH 蛋白質且佔 HAE 發生率之約 85%, 而 II 型之特徵在於低功能性 C1-INH (fC1-INH) 量但正常或升高之 C1-INH 蛋白質量且佔約 15%。當以單位/毫升量測時, 在未經治療之 I 型及 II 型患者中的典型 fC1-INH 為正常量之 5-30%。

【0004】 當前可供用於量測 fC1-INH 之檢定為基於血漿的檢定。常用檢定為發色檢定, 其使用合成 C1-酯酶特異性受質間接量測測試樣本中由 C1-INH

導致的 C1-酯酶活性抑制。另一常用檢定為量測 C1-INH 與補體蛋白質組分 C1s 之功能性結合的 ELISA 檢定。然而，樣本運送至集中測試實驗室及在其中的儲存通常不便於基於血漿的檢定。

【0005】 開發可在集中實驗室中操作用於量測生物樣本中之 fC1-INH 的簡單且用戶友好性方法受到了極大關注。

#### 【發明內容】

【0006】 本文之揭示內容至少部分基於對簡單、靈敏且具選擇性之檢定的開發，該檢定涉及將含有功能性血漿 C1-酯酶抑制子（fC1-INH）之乾燥血液樣點用於分析，該分析藉由例如經由液相層析-質譜法（liquid chromatography-mass spectrometry，LC-MS）量測來源於 C1-酯酶反應的受質產物（C1s 受質產物）來進行。

【0007】 因此，本文之揭示內容之一個方面提供一種用於測定乾燥血液樣本中之 fC1-INH 之量之方法，該方法包含：(i) 將來自個體之血液樣本點樣於支撐構件上；(ii) 將該支撐構件上的該血液樣本乾燥以形成乾燥血液樣點；(iii) 自來自 (ii) 之該乾燥血液樣點萃取蛋白質；及 (iv) 量測 (iii) 中所萃取之蛋白質中的 fC1-INH 之量（若存在）。如此量測可對照校準曲線或與校準曲線比較執行。在一些實例中，校準曲線可藉由用不含 C1-INH 的緩衝液或其他適合之組分對來自正常個體之全血進行連續稀釋來製備。

【0008】 在一些實例中，將該血液樣點乾燥之步驟 (ii) 可在室溫下執行 3 小時。在一些實例中，該支撐構件為濾紙。替代地或另外，自該乾燥血液樣點萃取蛋白質之步驟 (iii) 可藉由用牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）/PBS 緩衝液培育該乾燥血液樣點至少 3 小時來執行。

【0009】 在本文所揭示之任何方法中，量測 fC1-INH 之量的步驟 (iv) 可包含 (a) 將所萃取蛋白質與補體組分 1s（complement component 1s，C1s）及

C1s 受質一起培育以產生反應混合物；(b) 量測步驟 (a) 中所產生之 C1s 受質產物之量；及 (c) 基於步驟 (b) 中所量測的 C1s 受質產物之量來測定該乾燥血液樣點中的 fC1-INH 之量。在一些實例中，C1 受質產物可藉由液相層析-質譜法 (LC-MS) 或液相層析-串聯質譜法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 量測。

**【0010】** 在一些實施方式中，將所萃取蛋白質與補體組分 1s (C1s) 及 C1s 受質一起培育之步驟 (a) 可藉由將所萃取蛋白質與該 C1s 一起培育以產生反應混合物且隨後將該反應混合物與該 C1s 受質一起培育以產生 C1s 受質產物來執行。在一些情況下，C1s 受質產物之量可藉由液相層析-質譜法量測。例示性 C1s 受質包括 (但不限於) N<sup>α</sup>-苄甲氧羰基-Lys-苄甲硫醇酯，其產生 C1s 產物 N<sup>α</sup>-苄甲氧羰基-L-離胺酸 (cbz-Lys)。

**【0011】** 本文所述之任何方法可進一步包含自個體 (例如人類個體) 獲得該血液樣本 (例如全血樣本)。在一些實施方式中，該人類個體可為患有或疑似患有 C1-INH 缺乏介導之病症的人類患者，該病症諸如遺傳性血管水腫 (HAE)，例如 I 型 HAE 或 II 型 HAE。

**【0012】** 本文所述之方法可進一步包含確定該個體是否患有 HAE。與對照相比減小之 fC1-INH 之量 (與提高之 C1s 受質產物之量相關) 指示該個體患有血漿胰舒血管素 (plasma kallikrein, pKal) 及/或 C1-INH 缺乏介導之病症，諸如如本文所揭示之 HAE。本文所述之任何方法可進一步包含 (a) 基於功能性 C1-INH 之量識別用於個體之適合治療；(b) 基於如由本文所揭示之方法所測定的 fC1-INH 之量將個體識別為治療疾病之候選者；或兩者。

**【0013】** 本文所述之任何方法可進一步包含向藉由本文所揭示之任何方法識別為具有 C1-INH 缺乏介導之病症的風險或患有該病症的個體投予治療劑。在一些實施方式中，該治療劑可為血漿胰舒血管素 (pKal) 抑制子、緩激肽 B2 受體拮抗劑、或 C1 酯酶抑制子。實例包括 (但不限於) 艾卡拉肽

(ecallantide)、拉那蘆單抗 (lanadelumab)、艾替班特 (icatibant)、或人類血漿源性 C1 酯酶抑制子。

**【0014】** 本發明之一或多個實施方式之細節闡述於下文實施方式中。本發明之其他特徵或優點基於以下圖式及以下實施方式之許多實施方式以及基於隨附申請專利範圍會是顯而易見的。

### **【圖式簡單說明】**

#### **【0015】**

**【圖 1】**為說明用於分析 C1s 產物 (cbz-Lys) 之例示性基於乾燥血液樣點 (DBS) 之 fC1-INH 液相層析-串聯質譜法 (LC-MS/MS) 檢定的示意圖。

**【圖 2】**為說明在碰撞誘導之解離 (collision-induced dissociation, CID) 情況下 cbz-Lys 母離子之碎片化圖譜的例示性離子層析圖。選擇 m/z 91 處之最強峰為用於偵測之產物離子。

**【圖 3】**包括來源於以下者的展示 cbz-Lys 及內部標準物之例示性離子層析圖：作為對照之純淨緩衝溶液 (子圖 (1))；來自由具有最佳化體積比的紅血球與 BSA 溶液之混合物組成的替代基質的 DBS 萃取物之酶反應 (子圖 (2))；及自來自於健康個體之原始真全血樣本的 DBS 萃取物之酶反應 (子圖 (3))。

**【圖 4】**為展示 DBS 中 fC1-INH 之量測的校準曲線。

**【圖 5】**為說明用於量測 C1s 產物 (N<sup>α</sup>-苯甲氧羰基-L-離胺酸；cbz-Lys) 之例示性基於乾燥血液樣點 (DBS) 之 fC1-INH 液相層析-串聯質譜法 (LC-MS/MS) 檢定的示意圖。

**【圖 6A-6D】**展示代表性樣本之例示性離子層析圖。圖 6A 展示作為對照之純淨緩衝溶液中之 cbz-Lys 及內部標準物。圖 6B 展示空白替代基質中之 cbz-Lys 及內部標準物。圖 6C 展示匯集的原始真血液中之 cbz-Lys 及內部標準物。圖 6D 展示匯集的摻有 500 mU/mL C1-INH 之健康血液中之 cbz-Lys 及內部標準物。

mU/mL 為功能性 C1-INH 量之毫單位/毫升。

[圖 7]為展示 DBS 中 fC1-INH 之量測的代表性校準曲線。

[圖 8]為展示來自健康個體(n=103)及 HAE 患者(n=24)之樣本中的 fC1-INH 量之曲線圖。mU/mL 為功能性 C1-INH 量之毫單位/毫升。

[圖 9]為展示具有取自不同位置之孔 (N=3 或=6) 之 DBS 樣本 (樣點 A-D) 用於分析的相片。

### 【實施方式】

【0016】 C1-抑制子蛋白質 (C1-inhibitor protein, C1-INH) 中之基因缺乏引起遺傳性血管水腫 (HAE)。患有 HAE 之患者受通常由未知觸發事件而發生的疼痛水腫之急性發作影響。

【0017】 C1 酯酶 (C1s) 抑制子 (C1-INH) 為人類血漿之正常成分且屬於絲胺酸蛋白酶抑制子 (serine protease inhibitor, serpin) 群組, 該群組包括抗凝血酶 III、 $\alpha$ 1 蛋白酶抑制子、 $\alpha$ 2 抗纖維蛋白溶酶及肝素輔因子 II。如同此群組中其他抑制子一樣, C1-INH 對人體之數個主要級聯系統具有重要的抑制潛力, 該等主要級聯系統包括補體系統、內在凝血 (接觸) 系統、纖維蛋白溶解系統及凝血級聯。通常在發炎過程期間活化之 C1-INH 藉由與反應位點共價結合使其受質失活。C1-INH 為用於補體組分 1 之子組分 (C1r)、C1s、凝血因子 XIIa 及激肽釋放酶的唯一已知抑制子。另外, 其為用於內在凝血級聯中之凝血因子 Xia 的主要抑制子。

【0018】 HAE 主要可劃分成兩種類型。I 型之特徵在於低量之 C1-INH 蛋白質且佔 HAE 發生率之約 85%, 而 II 型之特徵在於低功能性 C1-INH (fC1-INH) 量但正常或升高之 C1-INH 蛋白質量且佔約 15%。當以單位/毫升量測時, 在未經治療之 I 型及 II 型患者中的典型 fC1-INH 為正常量之 5-30%。對來自患者之樣本中之 fC1-INH 的準確及可靠量測充當 HAE 診斷之基礎。

【0019】 當前，兩種類型之血漿測試用於測定 fC1-INH 之量。第一種檢定為發色檢定，其使用合成 C1s 特異性受質間接量測由測試樣本中之 C1-INH 對目標蛋白酶 C1s 之活性的抑制。第二種測試為基於 C1-INH 與補體蛋白質組分 C1s 之功能性結合的 ELISA 檢定。

【0020】 當前，建議將 fC1-INH 活性之血清或血漿量及蛋白質表現以及補體組分 4 (C4) 之量用於 I/II 型 HAE 之診斷，其中 fC1-INH 活性為最至關重要的測試 (參見例如 Maurer M, 等人 *Allergy* (2018)73:1575-96)。用於量測 fC1-INH 活性之習知方法涉及發色方法或複合物形成性免疫檢定。發色方法併入有合成 C1s 受質以量測血漿樣本中 C1-INH 蛋白質之抑制活性，其中顏色形成之缺少確證 C1-INH 誘導之抑制。然而複合物形成性免疫檢定方法在不直接量測 C1-INH 抑制活性的情況下偵測 C1-INH-C1s 複合物形成 (參見例如 Li HH, 等人 *J Allergy Clin Immunol Pract* (2015)3:200-5)。

【0021】 通常藉由濁度檢定來量測 C1-INH 及 C4 抗原量。此等檢定將需要在醫師門診對血液樣本進行即刻處理及適當儲存，且並非在所有地理區域中均為標準化、低本高效或可容易獲得的。迄今為止，診斷比率的範圍為在中國、墨西哥、日本、韓國 5-10%至在美國及西歐 75-80% (未公開資料)。開發簡單且標準化的用於在集中實驗室中量測 fC1-INH 之方法極受關注。

【0022】 基於乾燥血液樣點 (DBS) 之檢定已廣泛用於許多基因疾病之新生兒篩查或患者診斷，該等基因疾病諸如溶體貯積病 (lysosomal storage disease, LSD) (19-23)。來自多個報告之結果證明酶活性可保留於 DBS 樣本中 (2, 24)。與習知血漿或血清檢定相比，DBS 提供獨特的優點。首先，DBS 取樣 (例如使用手指刺破) 較無創傷性且並不需要較大體積之血液及任何實驗室儀器。其次，DBS 樣本可在環境溫度下運送及長期儲存而不顯著損失酶活性或遺傳資訊。此等優點保證 DBS 樣本可在醫師室中製備及在集中實驗室中測試。

【0023】 本文之揭示內容描述用於量測乾燥血液樣點 (DBS) 中功能性

C1 抑制子 (functional C1 inhibitor, fC1-INH) 量之檢定。此基於 DBS 之測試提供相對於基於血漿之發色或 ELISA 檢定之若干優點，例如較小血液體積、延長的於濾紙上乾燥後分析物穩定性，容易的樣本運送及儲存及/或允許在集中實驗室中測試患者樣本。

## I. 用於偵測功能性血漿酯酶 C1 抑制子 (fC1-INH) 之量之方法

【0024】 本文之揭示內容係關於藉由穩健液相層析-串聯質譜法 (LC-MS/MS) 使用由患者之全血樣本製備的乾燥血液樣點 (DBS) 測定 fC1-INH 量之方法。如此方法可用於診斷 C1-INH 缺乏介導之病症，諸如 HAE。該等方法可涉及製備 DBS 樣本、自 DBS 樣本萃取蛋白質、將蛋白質萃取物與補體組分 1s (C1s) 一起培育及與 C1s 受質反應以產生 C1s 受質產物，該 C1s 受質產物可藉由例如液相層析-串聯質譜法 (LC-MS/MS) 來加以量測。

### (i) 樣本製備

【0025】 可藉由本文所述之方法分析可能或可能不含有 C1-INH (例如 fC1-INH、非功能性 C1-INH 或兩者) 的任何樣本。如本文所用，「樣本」係指可能包含所關注分析物 (在本發明之情況下為 fC1-INH) 之組成物。樣本可包含來自個體之組織、血液、血漿或血清。術語「樣本」可涵蓋取自個體之初始未經處理樣本以及隨後經處理 (例如部分純化或保藏形式，例如經由免疫沈澱經處理) 之樣本兩者。例示性樣本包括血液、血漿、血清、淚液或黏液。在其他實例中，樣本可為來自試管內檢定之組成物。

【0026】 在一些實施方式中，樣本為體液樣本，諸如血清或血漿樣本。在一些實施方式中，樣本為自需要分析之個體獲得的生物樣本。「患者」、「個體」或「宿主」(此等術語可互換使用) 可指人類或非人類動物。在一些情況下，個體為可能患有與接觸系統相關之疾病、疑似患有該疾病、或具有該疾病的風險

之人類患者。舉例而言，人類患者可能先前患有 HAE 或可能具有 HAE 的風險。如此人類患者可先前用靶向接觸系統之組分的藥物(例如 C1s、血漿胰舒血管素)進行過治療或可正處於用該藥物進行治療之過程中。

**【0027】** 生物樣本可為體液樣本，例如血液樣本。在一些實例中，血液樣本為全血樣本。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。可使用所屬領域中已知之任何方法收集及處理用於本文所述之方法中的全血樣本。在一些實施方式中，藉由手指刺破（手指針刺）獲得樣本。在一些實施方式中，可使用真空血液收集管收集樣本。

**【0028】** 本文之揭示內容之樣本可具有對於執行至少一次如本文所述之 fC1-INH 量測檢定足夠的任何體積。在一些實施方式中，自個體獲得之樣本在 25  $\mu$ L-10 mL 之間。在一些實施方式中，用於本文所述之方法中之樣本或其等分試樣在 100  $\mu$ L-2 mL 之間。在一些實施方式中，樣本在 50  $\mu$ L-100  $\mu$ L 之間。在一些實施方式中，樣本在 50  $\mu$ L-1 mL 之間。在一些實施方式中，樣本為 50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、400  $\mu$ L、500  $\mu$ L、600  $\mu$ L、700  $\mu$ L、800  $\mu$ L、900  $\mu$ L、1 mL、1.1 mL、1.2 mL、1.3 mL、1.4 mL、1.5 mL、1.6 mL、1.7 mL、1.8 mL、1.9 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL、3.5 mL、4.5 mL、5.0 mL、5.5 mL、6.0 mL、6.5 mL、7.0 mL、7.5 mL、8.0 mL、8.5 mL、9.0 mL、9.5 mL 或 10.0 mL。在一些實施方式中，樣本為 60  $\mu$ L。

**【0029】** 可收集本文所揭示之任何樣本（例如全血樣本）及可將樣本之等分試樣取出且點樣於支撐構件上。在一些實施方式中，將含有樣本或樣本之等分試樣的支撐構件在適合條件（例如室溫）下維持適合之時間段（例如至少 1 小時、至少 2 小時、至少 3 小時、至少 4 小時或更長）以允許於支撐構件上形成樣本之乾燥樣點。

**【0030】** 支撐構件可為膜片、膜、濾紙或乾燥血液樣點卡。在一些實施方

式中，支撐構件可包含一或多個樣本收集區及視情況選用之環繞覆蓋物。可將支撐構件放入可密封容器中（例如 Ziploc® 袋子）以有助於樣本運送。在一些實施方式中，支撐構件可為可摺疊的。本文所述之任何支撐構件可進一步包含一或多個用於記錄樣本之其他資訊（例如個體之人口統計資訊）的區域。

**【0031】** 可使樣本（或其等分試樣）在適合時間段內在適合條件下於支撐構件上乾燥。在一些實施方式中，使樣本乾燥約 1-6 小時，例如 1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時或 6 小時。在一些實施方式中，使樣本乾燥約 1-2 小時、1-3 小時、1-4 小時、1-5 小時、2-3 小時、2-4 小時、2-5 小時、2-6 小時、3-4 小時、3-5 小時、3-6 小時、4-5 小時、4-6 小時或 5-6 小時。

**【0032】** 在一些實施方式中，使樣本在適合溫度下乾燥，例如在 10°C-40°C 之間或更高的溫度下。在一些實施方式中，使樣本在 10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C 或更高的溫度下乾燥。所屬領域中具通常知識者已知乾燥過程可在相對較高溫度下執行較短時間段或替代地在相對較低溫度下執行較長時間段。在一些實例中，可使樣本在室溫（約 25°C）下乾燥至少 3 小時。

## (ii) 蛋白質萃取

**【0033】** 如本文所述製備之乾燥樣點樣本（例如乾燥血液樣本）可經處理以萃取樣本中所含有的生物學材料，例如蛋白質。在一些實施方式中，乾燥樣點樣本（諸如 DBS 樣本）可經處理用於蛋白質萃取。如本文所用，蛋白質萃取係指將乾燥樣本中所含有的蛋白質或蛋白質之某一部分萃取至適合緩衝液（例如其中目標蛋白質為可溶性的）中。在一些情況下，可藉由習知方法（例如使用打孔器）將存在於支撐構件之樣本收集區域上的乾燥樣點樣本（諸如 DBS 樣本）與支撐構件之其餘部分分離。可將經分離生物材料樣本（諸如蛋白質樣本）

轉移至適合的容器用於進一步蛋白質萃取。適合容器之非限制性實例可為管子、培養皿、小瓶、多孔盤。在一些實例中，適合容器可為 96 孔盤。可同時處理一或多個乾燥樣點樣本（諸如 DBS 樣本）。

**【0034】** 任何適合之緩衝液可用於本文所述之方法。較佳地，緩衝液與待萃取之生物學材料相容（例如能夠溶解蛋白質且較佳地保持蛋白質功能）。適合緩衝液之非限制性實例包括磷酸鹽緩衝鹽水（phosphate-buffered saline, PBS）、杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水（Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS）或漢克氏平衡鹽溶液（Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS）。在一些實例中，緩衝液可為 PBS。在一些實施方式中，緩衝液可含有一或多種提高穩定性及/或防止待萃取生物學材料降解的組分。

**【0035】** 在一些實施方式中，用於萃取步驟中之緩衝液可包含一或多種在適合之濃度（例如 0.5%）下將有助於蛋白質萃取（例如牛血清白蛋白）之試劑。在一些實施方式中，可在允許完全萃取樣本中之所關注生物學材料（例如 fC1-INH）的適合條件下於緩衝液中培育含有乾燥樣點樣本（例如 DBS 樣本）之支撐構件或其一部分。在一些實施方式中，可在適合溫度（例如 25-37°C（例如 37°C））下於緩衝液中培育含乾燥樣點樣本之支撐構件持續適合之時間段（例如 2-5 小時（例如 3 小時））以允許對所關注生物學材料（例如蛋白質，包括 fC1-INH）進行足夠萃取以使得可量測 fC1-INH 之量。

**【0036】** 在一些實施方式中，可以適合速度，例如 800-2000 rpm（例如 1250 rpm）離心緩衝液/樣本混合物，以有助於將生物學材料萃取至溶液中。特定萃取條件（包括溫度、萃取時間段、緩衝液之使用、經或不經離心、離心速度等）之選擇可視例如待萃取的生物學材料之類型及用於形成乾燥樣點樣本之支撐構件而定。如此資訊已在所屬領域中具通常知識者之知識內。

*(iii) fC1-INH 之量測*

【0037】 可分析如上文所揭示製備之含有 fC1-INH 之溶液以測定溶液中的 fC1-INH 之量。在一些情況下，藉由測定 fC1-INH 之活性，例如藉由本文所揭示之習知途徑或方法來量測 fC1-INH 之量。

【0038】 可使用如所屬領域中已知或如本文所述之適合方法來量測 fC1-INH 之量。在一些實施方式中，藉由使用可由 C1s 分解之發色受質的發色檢定來量測 fC1-INH 之量。在一些實施方式中，如本文所述將免疫檢定用於評估所關注的 C1s 產物之量。免疫檢定之實例包括（但不限於）西方墨點、酶聯免疫吸附檢定（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）（例如夾層 ELISA）、放射免疫檢定、基於電化學發光之偵測檢定及相關技術。例如西方墨點檢定之檢定可進一步涉及定量成像系統之使用，例如可商購的 LICOR 成像技術（參見例如來自 LI-COR Biosciences 之 Odyssey<sup>®</sup> CLx 紅外成像系統）。在一些實施方式中，使用電化學發光偵測檢定或依賴於電化學發光與圖案化陣列技術之組合的檢定（例如來自 Meso Scale Discovery (MSD) 之 ECL 或 MULTI-ARRAY 技術檢定）。

【0039】 如本文所用，術語「量測（measuring/measurement）」或替代地「偵測（detecting/detection）」意謂評估樣本內一種物質之存在、不存在、數量或量（可為有效量），包括如此物質之定性或定量濃度水平的推導，或以其他方式估量個體之值或分類。

【0040】 在一些實施方式中，可將自本文所揭示之任何乾燥樣點樣本（例如 DBS 樣本）萃取的含 fC1-INH 之樣本與 C1s 蛋白酶及 C1s 受質一起培育。C1s 蛋白酶可作用於 C1s 受質以使 C1s 受質轉化成 C1s 受質產物，隨後可分析該 C1s 受質產物以確定 C1s 受質產物之存在及/或量。替代地，在與 C1s 蛋白酶及含 fC1-INH 之樣本一起培育後，可分析 C1s 受質以確定剩餘的 C1s 受質之存在及/或量。在藉由 fC1-INH 抑制 C1s 蛋白酶後，C1s 受質產物之產生將減少或消除。如本文所用，「C1s 受質產物」係指由 C1s 對 C1s 受質之蛋白酶反應產生的分解

產物。在一些實施方式中，C1s 受質及/或 C1s 受質產物之量可用作 C1s 蛋白酶及/或 fC1-INH 之活性的間接量度。

**【0041】** 在一些實施方式中，可首先在適合條件下將自本文所揭示之任何乾燥樣點樣本（例如 DBS 樣本）萃取的含 fC1-INH 之樣本與 C1s 蛋白酶一起培育適合之時間段。隨後可將 C1s 受質添加至混合物中，可在適合條件下進一步培育該混合物持續適合之時間段以允許產生 C1s 受質產物。在一些實施方式中，可在暗處執行培育。在一些實例中，該方法可包含使 C1s 蛋白酶反應中止之步驟，其可提高分析之準確度。在一些實施方式中，可藉由於中止用溶液中稀釋（例如 1:5-1:20）C1s 反應混合物來達成使 C1s 蛋白酶反應中止。如本文所用，「中止用溶液」係指用於使如本文所述之酶反應（例如 C1s 蛋白酶反應）停止之溶液。在一些實施方式中，中止用溶液可包含能夠使酶變性或失活之試劑。非限制性變性劑包括醇、清潔劑、強酸、強鹼、螯合劑等。在一些實施方式中，中止用溶液可含有清潔劑（例如 SDS）及/或醇（例如甲醇）。

**【0042】** 用於本文所揭示之方法中的 C1s 受質可為可藉由 C1s 蛋白酶分解以產生可偵測 C1s 受質產物之任何受質。C1s 受質之非限制性實例包括在 C1s 蛋白酶分解後產生 N<sup>α</sup>-苯甲氧羰基-L-離胺酸（cbz-Lys）之 N<sup>α</sup>-苯甲氧羰基-Lys-苯甲硫醇酯；及產生 C4a 及 C4b 之 C4。

**【0043】** 在一些實施方式中，在使酶反應中止之後，可進一步稀釋樣本用於隨後的液相層析-串聯質譜法（LC-MS/MS）分析。在一些實施方式中，可在適合溶液（例如 80% MeOH/水（v/v））中使樣本稀釋 200 倍。

**【0044】** 可藉由習知方法分析由此產生之 C1s 受質產物以確定其存在及/或量。在一些實施方式中，C1s 受質產物可藉由液相層析-質譜法（LC-MS）方法來分析，液相層析-質譜法為組合液相層析之物理分離能力與質譜法（mass spectrometry, MS）之質量分析能力的分析技術。可使用常規方法執行 LC-MS/MS 檢定。

【0045】 在一些情況下，用於分析 C1s 受質產物之質譜儀可在選擇反應監測 (selective reaction monitoring, SRM) 模式下操作。SRM 模式為用於串聯質譜法之具有高度靈敏性及選擇性之方法，其中在串聯質譜儀之第一級中選擇具有特定質量之離子且在第二質譜儀級中選擇前驅離子之碎片化反應的離子產物用於偵測。SRM 模式可用於藉由質譜法之靶向定量。在電離後，首先例如使用電噴霧源使前驅物分離以獲得大部分預期物種 (例如母離子) 之大量離子群體。隨後使此群體碎片化以得到產物離子，該等產物離子之信號豐度指示樣本中所關注的產物之豐度。在一些實施方式中，cbz-Lys 母離子可在  $m/z$  281，而選擇用於偵測之 cbz-Lys 產物離子可在  $m/z$  91。如在實施例中所述，可使用適合之儀器，諸如 ABSciex 5500 或 6500 QTrap 質譜儀，且可在方法最佳化之後評估各個樣本之間的差異。如本文所述，可製備個體全血樣本用於 LC-MS/MS 分析。

【0046】 可經由習知方法測定 C1s 受質產物之量 (例如濃度) (例如藉由 AUC 表示)，且由此可確定 fC1-INH 濃度。校準或標準曲線 (例如四參數邏輯校準曲線) 可藉由繪製 fC1-INH 濃度相對於分析物 (例如 cbz-Lys) 比內部標準物 (例如 Nε-苯甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6-d3 之濃度) 之峰面積比率而產生。可將校準曲線擬合成方程式，例如：

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (\text{方程式 1})$$

其中 y 指峰面積比率；x 指樣本濃度；及 A、B、C 及 D 為曲線擬合參數。

【0047】 在一些實施方式中，可藉由分析使用本文所述之方法製備的校準標準物驗證 LC-MS/MS 方法之準確度及再現性。在一些實施方式中，樣本中的 fC1-INH 之量 (例如濃度) 可藉由方程式 (例如方程式 1) 計算。此等結果指示藉由樣本 (由本文所述之方法製備) 中 C1s 受質產物之量表示及計算的 fC1-INH 之量為用於 HAE 診斷之可靠生物指標。

【0048】 在一些情況下，校準曲線可用所關注分析物 (C1s 標誌產物) 比

內部標準物之峰面積比率構建。如本文所用，「內部標準物」係指以常量添加至測試樣本、品質控制（quality control，QC）樣本、空白及校準標準物以校正樣本製備期間分析物之損失且由此提高分析物分析之準確度的化學物質。在一些實施方式中，內部標準物為  $N\epsilon$ -苯甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6-d3 或另一穩定的經同位素標記之 C1s 受質產物。在一些實施方式中，校準曲線可用於定量分析。

**【0049】** 另外，可製備一系列校準標準物，且作為檢定之校準劑及出於品質控制目的與樣本一起進行 LC-MS/MS 分析。如本文所用，校準標準物係指含有已知量之所關注分析物或材料（例如在本文之揭示內容中之 fC1-INH）的全血或溶液。校準標準物可用於以與樣本相同之方式測試具有已知濃度的材料以確保測試系統準確量測整個可報導範圍中之樣本。校準標準物可藉由將不同已知量之所關注材料（例如 fC1-INH）添加至初始不含所關注材料或所關注材料耗盡之溶液中來製備。在一些實例中，可將所關注材料（例如 fC1-INH）添加至與測試樣本（例如全血樣本）相似之生物樣本中以模擬測試樣本（例如替代基質）。在一個實例中，校準標準物可藉由將 fC1-INH（例如經純化 fC1-INH）與 fC1-INH 耗盡之替代血液混合來製備。如本文所用，fC1-INH 耗盡之替代血液可藉由以下製備：(i) 藉由適合方法（例如抽空血液收集管）自適合群體（理想地與個體（subject）（例如健康個體（individual），男性及/或女性）相同之物種）獲得及/或匯集新鮮全血；(ii) 藉由使用適合方法（例如在室溫下以 800 rpm 離心 10 min）移除上清液血漿來耗盡血液樣本中的內源性所關注材料（例如 fC1-INH）；(iii) 將適合體積（例如相等體積）之所匯集剩餘紅血球與適合緩衝液（例如含約 4.3% BSA 之 PBS）混合。如本文所述，所關注材料（例如 fC1-INH）之校準標準物及品質控制組（QC）可藉由將各個已知濃度之含有所關注材料（例如 fC1-INH）的溶液摻入至 fC1-INH 耗盡之替代血液中來製備。如本文所述，在 LC-MS/MS 分析之前可對校準標準物進行生成 C1s 受質產物之方法。

**【0050】** 在一個特定實例中，本文所述之方法可包含：(1) 自全血樣本製

備 DBS 卡之程序；(2) 自 DBS 卡萃取 C1-INH 蛋白質；(3) 將所萃取蛋白質與補體組分 C1s 一起培育；(4) 與 C1s 受質  $N^{\alpha}$ -苄甲氧羰基-Lys-苄甲硫醇酯進行酶反應以產生酶產物  $N^{\alpha}$ -苄甲氧羰基-L-離胺酸 (cbz-Lys)；及 (5) 隨後藉由 LC-MS 檢定使用  $N^{\epsilon}$ -苄甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6- $d_3$  作為用於定量之內部標準物來量測 cbz-Lys。

## II. 乾燥樣點檢定方法之應用

【0051】 本文所述之用於量測樣本中之 fC1-INH 的檢定方法可用於臨床或非臨床目的。

### (i) 疾病診斷及預後

【0052】 C1-INH 缺乏介導之病症（諸如遺傳性血管水腫（HAE））之診斷可基於自候選個體獲得之樣本中的 fC1-INH 之量。

【0053】 可將本文所述之檢定方法及套組用於疾病之估量，例如疾病之診斷或預後。估量可包括將個體識別為具有如本文所述之疾病的風險或患有如本文所述之疾病，例如 C1-INH 缺乏介導之病症，諸如 HAE（例如 I 型 HAE 或 II 型 HAE）。估量亦可包括監測疾病之治療，諸如估量用於 C1-INH 缺乏介導之病症（諸如 HAE）的治療之有效性。此外，估量可包括識別可藉由 pKal 抑制子治療，諸如藉由 C1s 抑制子（例如來源於人類血漿之 C1s 抑制子）或血漿激肽釋放素抑制子治療的疾病。

### A. 診斷

【0054】 在一些實施方式中，將本文所述之檢定、方法及套組用於確定自候選個體（例如疑似患有 C1-INH 缺乏介導之病症（例如 HAE）的人類患者）收集之生物樣本（例如全血樣本）中的 fC1-INH 之量。fC1-INH 之量可基於藉

由本文所述之方法（例如藉由 4 參數邏輯校準曲線）生成的 C1s 受質產物之量而確定。可將如此 fC1-INH 量與預定參考值或參考比率比較以確定個體是否患有 C1-INH 缺乏介導之病症（例如 HAE）或具有該病症之風險。舉例而言，若候選個體之樣本中的 fC1-INH 處於或低於參考值，則該個體可識別為患有 C1-INH 缺乏介導之病症（諸如 HAE）或具有該病症之風險。

**【0055】** 如本文所述，參考樣本可為 fC1-INH 之對照量。在一些實施方式中，對照量表示自健康個體或健康個體之群體（該等健康個體較佳地與候選個體具有相同的物種及年齡）獲得之對照樣本（例如全血樣本）中的 fC1-INH 之量。如本文所用，健康個體為在量測 fC1-INH 之量時明顯無目標疾病（例如 C1-INH 缺乏介導之病症，諸如 HAE）或無該疾病病史之個體。

**【0056】** 替代地，參考值可為預定值。如此預定標誌 fC1-INH 可代表不患有目標疾病或不具有目標疾病之風險的個體群體中的如本文所述之 fC1-INH 值。

**【0057】** 預定值可採取多種形式。舉例而言，其可為單個截斷值，諸如中位值或平均值。在一些實施方式中，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，預定量可為處於預定百分位內的對照群體中之範圍，例如 fC1-INH 範圍。

**【0058】** 如本文所述對照值可藉由常規技術測定。在一些實例中，對照值可藉由對對照樣本執行如本文亦描述之習知方法（例如如本文所述相同的用於獲得 fC1-INH 之量之檢定）來獲得。在其他實例中，fC1-INH 之量可自對照群體之成員獲得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）。

**【0059】** 藉由比較自候選個體獲得之樣本中本文所述之 fC1-INH 的濃度與如本文所述之參考比率，可確定關於候選個體是否患有 C1-INH 缺乏介導之疾病（例如 HAE）或具有該疾病之風險。舉例而言，若候選個體之樣本中的 fC1-INH

之值偏離參考值或比率（例如與參考值相比減小），則該候選個體可識別為患有該疾病或具有該疾病之風險。當參考值表示患有目標疾病之個體群體中如本文所述之 fC1-INH 的值範圍時，候選者之樣本中的 fC1-INH 之值落於該範圍內指示候選個體患有目標疾病或具有該目標疾病之風險。

**【0060】** 如本文所用，「低於參考值之減小的值」意謂 fC1-INH 之量低於參考值，諸如對照樣本中的 fC1-INH 之預定臨限。本文詳細描述對照量。減小的 fC1-INH 值包括例如比對照樣本之參考值低 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500% 或更多的值。

**【0061】** 在一些實施方式中，候選個體為具有 C1-INH 缺乏介導之病症（例如，諸如 HAE）之一或多種症狀的人類患者。舉例而言，個體可具有水腫、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證據下之腫脹；非組織胺介導之水腫、腫脹復發性發作或其組合。在其他實施方式中，在收集樣本時個體無 C1-INH 缺乏介導之病症之症狀、無 C1-INH 缺乏介導之病症之症狀的病史或無 C1-INH 缺乏介導之病症（諸如 HAE）之病史。在又其他實施方式中，個體對抗組織胺療法、皮質類固醇療法或兩者具有抗性。

## B. 識別適合之治療

**【0062】** 在一些實施方式中，本文所述之檢定方法及套組亦可用於識別用於患有 C1-INH 缺乏介導之病症（例如 I 型 HAE 或 II 型 HAE）或具有患有該病症之風險的個體之適合治療。舉例而言，個體之 fC1-INH 之量可使用如本文所述之任何方法來量測且將其與 fC1-INH 之預定值比較。若個體之 fC1-INH 值處於或低於預定值，則該個體可藉由基於 fC1-INH 之預定值的治療（例如如本文所述之重組 C1-INH 治療劑或其他治療劑）來治療。在一些實例中，個體可為進行基於 fC1-INH 之量之疾病的治療之候選者。

【0063】 在一些實施方式中，本文所述之方法進一步包含向患有 C1-INH 缺乏介導之病症（例如 HAE）或具有患有該病症之風險的個體投予治療劑。治療劑之非限制性實例包括血漿激肽釋放素（pKal）抑制子（例如艾卡拉肽、拉那蘆單抗）、緩激肽 B2 受體拮抗劑（例如艾替班特）及 C1s 抑制子（例如人類血漿源性 C1s 抑制子）。

*(ii) 非臨床應用*

【0064】 此外，本文所述之檢定方法可具有非臨床應用，例如用於研究目的及/或臨床前藥物開發目的。儘管已識別許多與 C1-INH 缺乏相關之疾病，但有可能其他疾病由類似機制介導或涉及類似組分。在一些實施方式中，本文所述之方法可用以將疾病識別為與 C1-INH 缺乏相關。在一些實施方式中，本文所述之方法可用以研究疾病之機制（例如探索涉及疾病發展之新型生物學路徑或過程）或進展。

【0065】 在一些實施方式中，藉由如本文所述之檢定方法確定的 fC1-INH 之量可用於開發用於與 C1-INH 缺乏相關之疾病的新型治療劑。舉例而言，如本文所述之 fC1-INH 之量可在自己投予新型療法（例如基因療法）之個體獲得的樣本中或在自試管內檢定獲得之樣本中量測。在一些實施方式中，fC1-INH 量可指示新型治療劑在試管內檢定中之活性或新型治療劑在臨床試驗設置中之功效。

### III. 用於執行乾燥樣點檢定方法之套組

【0066】 本文之揭示內容亦提供用於量測如本文所述之 fC1-INH 之量的套組。如此套組可包含用於收集及製備樣本、自樣本萃取蛋白質之材料；用於量測樣本中之 fC1-INH 的組分及/或用於檢定樣本中之 fC1-INH 量的說明書。

【0067】 在一些實施方式中，套組包含支撐構件，諸如膜片、濾紙或乾燥

血液樣點卡。用於該方法之適當支撐構件之選擇將視各種因素而定，諸如待評估的樣本之數量及自樣本萃取蛋白質之方法。

【0068】 在一些實施方式中，支撐構件為多孔盤，諸如 ELISA 盤。在一些實施方式中，本文所述之免疫檢定可於高通量平台上進行。在一些實施方式中，多孔盤，例如 24 孔盤、48 孔盤、96 孔盤、384 孔盤或更多孔之盤可用於高通量免疫檢定。個別免疫檢定可在各孔中並行進行。因此，一般期望使用讀盤器來並行量測多個孔以增加檢定通量。在一些實施方式中，能夠使多孔（例如 4、16、24、48、96、384 或更多孔）並行成像之讀盤器可用於此平台。

【0069】 套組亦可包含一或多種如本文所述之緩衝液，但不限於中止用緩衝液、變性用緩衝液及蛋白質萃取緩衝液。緩衝液之實例包括（但不限於）PBS、DPBS、HBSS、HEPES、Tris、Tris-HCl、磷酸鈉、磷酸鉀及氯化鉀。

【0070】 在一些實施方式中，套組可包含根據本文所述之任何方法的使用說明書。所包括的說明書可包含如何使用套組中所含有的組分用於量測自個體（諸如人類患者）收集之生物樣本中的 fC1-INH 之量之描述。

【0071】 與套組之使用相關之說明書通常包括關於各組分之量及用於執行本文所述之方法之適合條件的資訊。套組中之組分可呈單位劑量、整體包裝（例如多劑量包裝）或次單位劑量。本文之揭示內容之套組中提供的說明書典型地為標籤或包裝插頁（例如套組中所包括之紙張）上之書面說明書，但機器可讀說明書（例如磁性或光學儲存磁碟上攜帶之說明書）亦可接受。

【0072】 標籤或包裝插頁指示套組用於估量一或多個樣本中的 fC1-INH 之量。可提供說明書用於實踐本文所述之任何方法。在一些實施方式中，套組可包括用於在分析之前運送乾燥樣本之可密封容器（例如 Ziploc® 袋子）。

【0073】 本文之揭示內容之套組在適合包裝中。適合包裝包括（但不限於）小瓶、瓶子、罐、軟包裝（例如密封 Mylar 或塑膠袋）及其類似物。

【0074】 套組可視情況提供其他組分，諸如說明資訊，諸如對照及/或標

準或參考樣本，例如以生成校準曲線。通常，套組包含容器及在容器上或與容器相聯之標籤或包裝插頁。在一些實施方式中，本文之揭示內容提供包含上文所述之套組之內含物的製品。

**【0075】** 無需進一步詳細描述，咸信所屬技術領域中具有通常知識者可基於上文描述最大程度地利用本發明。因此，以下特定實施方式應理解為僅為說明性的且無論如何不以任何方式限制本文之揭示內容之其餘部分。本文引用之所有出版物以引用的方式併入用於本文提及之目的或主題。

## 實施例

### 實施例 1：基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定

**【0076】** 此實施例描述基於乾燥血液樣點 (DBS) 之 LC-MS/MS 分析，其用於量測血液樣本中之功能性 C1-抑制子 (fC1-INH)。圖 1 說明此檢定之例示性流程。

**【0077】** 該方法旨在確定人類全血樣本中之 fC1-INH 量。該方法涉及製備校準標準物、品質控制組 (QC) 及 DBS 樣本；自 DBS 樣本萃取蛋白質；將蛋白質萃取物與補體組分 1s (C1s) 一起培育、與 C1s 受質 N<sup>α</sup>-苄甲氧羰基-Lys-苄甲硫醇酯反應以產生 N<sup>α</sup>-苄甲氧羰基-L-離胺酸 (cbz-Lys)；及隨後使用液相層析-串聯質譜法 (LC-MS/MS) 量測 cbz-Lys。以選擇反應監測 (SRM) 模式在用於以正離子模式偵測 cbz-Lys 及內部標準物 (Nε-苄甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6-d3) 的最佳化條件下操作 AB Sciex QTrap 6500 質譜儀。

實驗程序：

#### (i) 製備校準標準物及品質控制組 (QC)

**【0078】** 由耗盡 C1-INH 蛋白質之替代血液製備校準劑及品質控制組

(QC)。簡言之，匯集來自健康個體(男性及女性)之新鮮全血並將其於 1200 ×g 及室溫下離心 10 min。丟棄上清液血漿且用磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 溶液洗滌所得紅血球一次。不含 C1-INH 之替代血液藉由將等體積的匯集紅血球與含 4.3% 牛血清白蛋白 (BSA) 之 PBS 混合來製備。為製備校準標準物及 QC，將不同濃度之 C1-INH 溶液摻入替代血液中。

### (ii) 製備 DBS 樣本

【0079】 在收集全血樣本之後，將最多 60 μL 等分試樣沈積於 DBS 卡(903 蛋白質保存卡，Whatman) 之濾紙樣點上。將 DBS 卡彎曲以使得背面不與任何表面接觸以防止浸透濾紙之血液損失。使卡乾燥至少 3 小時且在室溫下儲存。

【0080】 為了製備校準劑、QC 及測試樣本，使用 DBS 打孔器 (GE Health Care Life Science Whatman) 打孔 3.0 mm 孔洞且將 DBS 樣本轉移至具有 500 μL 96 孔盤 (Eppendorf Protein Lobind) 之小瓶。藉由在以 1250 rpm 操作培育箱中在 37°C 下用 100 μL 含 0.5% BSA 之 PBS 緩衝液培育 3 小時來萃取 DBS 樣本。將所萃取樣本之等分試樣 (20 μL) 轉移至另一 96 孔盤且使其與 50 μL 之於含 0.5% BSA 之 PBS 中新鮮製備的 0.5 μg/mL C1s 溶液混合。在以 800 rpm 及 37°C 培育 1.5 小時之後，添加 105 μL 受質溶液 (N<sup>α</sup>-苯甲氧羰基-Lys-苯甲硫醇酯) 與內部標準物 (N<sup>ε</sup>-苯甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6-d<sub>3</sub>) 之混合物且藉由在暗處在室溫下培育 40 min 使酶反應進行。藉由將 50 μL 之反應溶液轉移至 450 μL 之含 0.1% SDS 的 MeOH/水 (80/20, V/V) 使反應中止。在 LC-MS/MS 分析之前將上文樣本用 MeOH/水 (80/20, V/V) 進一步稀釋 200 倍。

### (iii) LC-MS/MS 分析

【0081】 未反應受質、受質產物 (分析物, cbz-Lys) 及內部標準物之分離於設置為 30°C 之 Waters Acquity UPLC 上使用逆相管柱 (Waters Xbridge Protein

BEH C4, 3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 50 mm) 來達成。流動相 A 為含 0.1% 甲酸之水及流動相 B 為乙腈。流動速率為 0.3 ml/min 且流動相梯度由以下時間點之間的梯度步長 (時間, B%) 組成: 0 min, 4%; 0.5 min, 4%; 3.5 min, 12%; 3.6 min, 70%; 4.6 min, 70%; 4.7 min, 4%; 5.5 min, 4%。自動取樣器溫度設置為 4°C, 且以局部環路 LC 注入模式注入 3  $\mu\text{L}$  之樣本。於以選擇反應監測 (SRM) 模式操作之 AB Sciex QTrap 6500 質譜儀上使用由電噴霧電離所形成的正離子在用於偵測 cbz-Lys 及內部標準物 (N $\epsilon$ -苯甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6-d<sub>3</sub>) 的最佳化設置下採集分析物及內部標準物信號。

【0082】 最佳化 MS 參數設置如下: 氣簾, 20; 碰撞氣體, 中等; 離子噴霧電壓, 4000; 溫度, 550; 離子源氣體 1, 50; 離子氣體源 2, 50; 去簇電壓 (declustering potential), 120; 入口電壓, 10.0; 碰撞能量, 26.0; 碰撞室出口電壓, 12.0。分析物及內部標準物分別用 m/z 281.2 變為 m/z 91.0 及 m/z 284.2 變為 m/z 91.0 之 SRM 離子監測。

#### (iv) 數據分析

【0083】 分析物及內部標準物之峰面積藉由 Analyst 軟體確定。用分析物比內部標準物之峰面積比率及標準物中摻入的 fC1-INH 之濃度, 使用 SoftMax Pro 7.0 構建 4 參數邏輯校準曲線。樣本中之 fC1-INH 量係基於以下方程式計算。

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (\text{方程式 1})$$

其中 y 為峰面積比率; x 為樣本濃度; A、B、C 及 D 為曲線擬合參數。另外, 使用 Excel 計算準確度及相對標準差 (relative standard deviation, RSD)。

## 結果

【0084】 圖 2 展示在碰撞誘導之解離 (CID) 情況下 cbz-Lys 前驅物離子

之碎片化圖譜。選擇  $m/z$  91 處之最強峰為用於偵測之產物離子。

【0085】 圖 3 顯示 *cbz-Lys* 及內部標準物 (IS) 之離子層析圖，*cbz-Lys* 及內部標準物 (IS) 來源於 (1) 作為對照之純淨緩衝溶液；(2) 來自具有最佳化體積比的紅血球與 BSA 溶液之混合物組成的替代基質的 DBS 萃取物之酶反應產物；(3) 來自來自於健康個體之原始真全血樣本的 DBS 萃取物之酶反應產物。*cbz-Lys* 及 IS 展示來自不同樣本來源之可再現保留度。另外，來自純淨溶液及替代血液基質之 *cbz-Lys* 峰強度極相似，意味著替代血液基質中之剩餘 fC1-INH 最少。另一方面，來源於 fC1-INH 正常之健康血液樣本的 *cbz-Lys* 強度顯著降低，表明 fC1-INH 之存在抑制 C1s 酶活性。該圖證實在 DBS 萃取物之酶反應後偵測 *cbz-Lys* 之可行性。

【0086】 量測 DBS 中之 fC1-INH 的校準曲線展示於圖 4 中。

【0087】 為了估量基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定的操作間再現性，收集來自六名單獨個體之匯集血液樣本且在不同的三天使用基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定進行分析。檢定之結果展示於表 1 中。檢定之精確度 (CV%約 10.3) 極好。

表 1.基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定的操作間再現性

匯集之全血 (Whole Blood, WB) 由六個批次之個體製備

操作日期/編號	量測之濃度 (mU/mL)	平均濃度 (mU/mL)	同日內 SD	同日內 CV (%)
2018 年 11 月 15 日 (操作編號 1)	559	507	54.5	10.8
	542			
	495			
	557			
	460			
	429			
2018 年 11 月 16 日 (操作編號 3)	567	491	43.2	8.8
	502			
	501			
	459			
	455			
	459			

2018 年 11 月 19 日 (操作編號 5)	573	556	44.0	7.9
	563			
	604			
	536			
	479			
583				
異日間平均 (mU/mL)	518			
異日間 SD	53.1			
異日間 CV (%)	10.3			

【0088】 為估量基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定的同日內再現性，將 C1-INH 以不同濃度摻入紅血球基質中作為品質控制組（定量之下限（lower limit of quantitation, LLOQ）、低、中及高）。隨後使用基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定分析樣本。結果顯示在表 2 中。自檢定獲得之 fC1-INH 之量對應於摻入樣本中之 fC1-INH 之量，指示此檢定在使用 DBS 量測 fC1-INH 中的精確度。

表 2.基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定的同日內再現性

QC 樣本			同日內 (n=6)		
樣本名稱	樣本基質	標稱濃度 (mU/mL)	量測之濃度±S.D. (mU/mL)	R.S.D. (%)	RE (%)
QC LLOQ	紅血球+BSA 基質	100	97.9 ± 10.4	10.6	-2.2
QC 低		150	136 ± 10.4	7.7	-9.3
QC 中		750	745 ± 22.0	3.0	-0.7
QC 高		1130	1064 ± 69.4	6.5	-5.8

### 實施例 2：基於 DBS 之 LC-MS/MS fC1-INH 檢定的用途

【0089】 本文描述用於 HAE 患者之診斷的能夠量測 DBS 中之 fC1-INH 活性的新型檢定之開發及驗證。遵循管理準則及行業最佳慣例驗證該檢定。來自 HAE 患者之 DBS 樣本展示顯著較低的 fC1-INH 活性，允許區分 HAE 患者與健康個體。

### 實驗程序

*(i) 材料*

【0090】  $N^{\alpha}$ -苯甲氧羰基-Lys-苯甲硫醇酯鹽酸鹽 (Z-Lys-SBzl·HCl, C1s 受質) 及  $N^{\epsilon}$ -苯甲氧羰基-L-離胺酸-2,6,6- $d_3$  ( $N^{\epsilon}$ -CBZ-L-離胺酸- $d_3$ , 內部標準物) 分別購自 BACHEM (美國, 加利福尼亞州, 托蘭斯) 及 CDN Isotopes (加拿大, 魁北克)。重組人類補體組分 C1s (C1s) 係購自 R&D System (美國, 明尼蘇達州, 明尼阿波利斯)。重組 C1-INH (CINRYZE®) 為內部獲得。牛血清白蛋白 (BSA) 獲自 Americanbio (美國, 馬薩諸塞州, 納蒂克)。十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶液 (10%) 為 Sigma (美國, 密蘇里州, 聖路易斯) 之產品。500  $\mu$ L 96 孔盤 (Eppendorf Protein LoBind) 係購自 Eppendorf (德國, 漢堡)。3 mm 打孔器及 Whatman #903 蛋白質保存卡係購自 GE Health Care Life Science (英國, 白金漢郡, 小查爾方頓)。乾燥劑 (1 g) 及生物危害品袋係獲自 VWR (美國, 賓夕法尼亞州, 拉德納)。用於研究之所有其他化學物質均為最高等級且未經進一步純化即使用。

*(ii) 製備溶液*

【0091】 藉由用於 PBS 緩衝液中製備之 0.5% BSA 溶液將 C1s 儲備溶液 (367  $\mu$ g/mL) 稀釋 734 倍來新鮮製備 C1s 工作溶液 (0.5  $\mu$ g/mL)。藉由將 Z-Lys-SBzl·HCl 溶解於 DMSO 中至最終濃度為 10 mM 來製備受質儲備溶液。藉由將  $N^{\epsilon}$ -CBZ-L-離胺酸- $d_3$  溶解於含 5 mM  $Na_2CO_3$  之甲醇/水 (50/50) 溶液中來製備內部標準物 (IS) 儲備溶液 (2.5 mM)。受質、C1s 及 IS 儲存溶液在使用之前在  $-80^{\circ}C$  下儲存。含有 0.83 mM 之 Z-Lys-SBzl·HCl 及 33.3  $\mu$ M 之  $N^{\epsilon}$ -CBZ-L-離胺酸- $d_3$  的受質-IS 混合液於 PBS 緩衝液中新鮮製備。SDS 溶液 (0.1%) 藉由將 10% SDS 用甲醇/水 (80/20, V/V) 溶液稀釋 100 倍來製備。

*(iii) 製備 DBS 樣本*

【0092】 提供來自 24 名先前經診斷之 HAE 患者的全血與患者之書面知情同意書。將血液吸入真空管 EDTA 管且在 4°C 下儲存。在收集之 24 小時內，將管子倒置若干次以使血細胞再懸浮，且將 60  $\mu$ L 等分試樣點樣至濾紙樣點上。來自 103 名健康個體之正常人類全血購自 BIOIVT（美國，紐約，韋斯特伯里）。在室溫下將血液樣點乾燥至少 3 小時且將其於 -20°C 下儲存於密封的生物危害品袋中，每個袋子中一份乾燥劑。

(iv) 製備不含 C1-INH 之血液作為替代基質

【0093】 為獲得用於製備校準曲線及品質控制 (QC) 的耗盡 fC1-INH 之替代基質，如實施例 1 中所述製備六個不同批次之人類全血樣本（三批男性及三批女性，每個 10 mL）。簡言之，在室溫下以 1200 x g 離心全血 10 min。移除上清液血漿，將紅血球用 5 mL PBS 溶液洗滌以移除剩餘血漿及 fC1-INH。藉由在室溫下以 1200 x g 離心 10 min 再次分離紅血球。匯集所得不含 fC1-INH 之紅血球。替代血液基質藉由將相等體積之匯集的紅血球與於 PBS 緩衝液中製備的 4.3% BSA 混合來製備。

(v) 在 DBS 中製備校準標準物及 QC 樣本

【0094】 校準標準物 (校準劑) 藉由將不同濃度之 fC1-INH (CINRYZE®) 摻入至替代基質中來製備。標稱 fC1-INH 濃度分別為 100、200、300、500、1000 及 1500 mU/mL。於替代基質或匯集的人類全血中製備品質控制 (QC) 樣本。在替代基質中製備定量之下限 (LLOQ) QC (100 mU/mL) 及低 QC (150 mU/mL)。藉由考量內源性 C1-INH 量 (EL) 來在匯集的全血中製備所有其他 QC：低-中 QC (EL)、中 QC (EL+200 mU/mL)、中-高 QC (EL+500 mU/mL) 及高 QC (EL+800 mU/mL)。在 DBS 中製備校準劑及 QC 遵循上文所述相同程序。

(vi) 樣本萃取及酶反應

【0095】 萃取樣本及如實施例 1 中所述執行酶反應。簡言之，使用 3 mm 打孔器切割 DBS 圓盤且將其轉移至 500  $\mu$ L 96 孔盤。藉由於熱混合器培育箱中以 1250 rpm 渦旋在 37°C 之溫度下在 100  $\mu$ L 含 0.5% BSA 之 PBS 中培育 3 小時來萃取圓盤中之蛋白質。以 4000 rpm 離心該盤 3 min，且隨後將 20  $\mu$ L 萃取物轉移至另一含有 50  $\mu$ L C1s 工作溶液之 96 孔盤。此後以 800 rpm 在 37°C 下培育 1.5 小時。隨後，將 105  $\mu$ L 受質-內部標準物 (受質-IS) 混合液添加至上文溶液中，隨後以 800 rpm 在室溫下在暗處培育 40 min。藉由轉移 50  $\mu$ L 溶液至 450  $\mu$ L 含 0.1% SDS 之 MeOH/水 (80/20, v/v) 來使反應終止。在 LC-MS/MS 分析之前用 MeOH/水 (80/20, v/v) 將所得樣本進一步稀釋 200 倍。

(vii) LC-MS/MS 分析

【0096】 如實施例 1 中所述藉由 LC-MS/MS 分析反應樣本。簡言之，於 Waters Acquity UPLC 系統上使用管柱溫度維持在 30°C 之逆相管柱 (Waters Xbridge Protein BEH C4, 3.5  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 50 mm) 達成受質 (Z-Lys-SBzl·HCl)、分析物 (N<sup>α</sup>-苄甲氧羰基-L-離胺酸, cbz-Lys) 及 IS (N<sup>ε</sup>-CBZ-L-離胺酸-d<sub>3</sub>) 之分離。流動相 A 為含 0.1% 甲酸之水及流動相 B 為乙腈。流動速率為 0.3 mL/min 且流動相梯度如下 (時間, B%) : 0 min, 4% ; 0.5 min, 4% ; 3.5 min, 12% ; 3.6 min, 70% ; 4.6 min, 70% ; 4.7 min, 4% ; 5.5 min, 4%。自動取樣器設置為 4°C，且使用局部環路 LC 注入模式注入 3.0  $\mu$ L 之樣本。於以選擇反應監測 (SRM) 模式操作之 AB Sciex QTrap 6500 質譜儀上使用正離子來定量分析物及 IS。最佳化 MS 參數如下：氣簾，20；碰撞氣體，中等；離子噴霧電壓，4000；溫度，550；離子源氣體 1，50；離子氣體源 2，50；去簇電壓，120；入口電壓，10.0；碰撞能量，26.0；碰撞室出口電壓，12.0。分析物及 IS 分別使用 m/z 281.2 變為 m/z 91.0 及 m/z 284.2 變為 m/z 91.0 之 SRM 離子對監測。

## (viii) 符合目的檢定驗證

【0097】 符合目的檢定驗證遵循生物標誌物及基於 DBS 之診斷性檢定的行業最佳慣例 (1-6)。在各種條件下驗證方法之校準曲線、準確度、精確度、基質作用、血容比、萃取、取樣位置及穩定性。

【0098】 藉由每天分析以每種濃度水平處於替代基質及原始真基質中的 QC 樣本之六個複本持續三天來估量準確度 (相對誤差或 RE%) 及精確度 (RSD%)。依序計算同日內及異日間平均準確度及精確度。藉由在運行定量之上限 (ULOQ) 校準劑之後注入空白溶液來檢驗分析物殘留。

【0099】 使用來自四名健康個體之全血來估量血容比水平對檢定效能之影響。簡言之，藉由以  $1200 \times g$  離心 10 min 使血漿與紅血球分離。隨後，混合不同體積之血漿與紅血球以分別達成 25%、45%、60% 及 75% 之血容比水平。將來源於 45% 血容比之 DBS 樣本用作對其他血容比水平下之 C1-INH 活性進行歸一化的參考。

【0100】 藉由使用來自一個樣點上之 3-6 個打孔位置及來自總共四個不同 DBS 樣點的低及中-高 QC 樣本來評估打孔位置對 DBS 樣點及 DBS 樣點之偏差的影響 (圖 9, 表 3)。在替代基質中製備低 QC 而在匯集的全血中製備中-高 QC。

表 3. DBS 均質性測試之概述

	QC 樣本	
	替代基質中之低 QC	原始真基質中之中-高 QC
標稱濃度 (mU/mL)	150	1020
基質	用 BSA 再提供之紅血球	匯集的全血
總複本, N	18	18
量測之濃度 $\pm$ S.D. (mU/mL)	$143 \pm 13.1$	$915 \pm 75.0$
R.S.D (%)	9.2	8.2
RE (%)	-4.6	-10.3

【0101】 使用以 100、600 及 1000 mU/mL 在替代基質中製備之 QC，藉由比較預摻入型樣本與後摻入型樣本之結果來估量萃取效率。藉由在製備 DBS 卡之前將 C1-INH 摻入替代基質中來製備預摻入型樣本。另一方面，藉由將相同濃度之 C1-INH (3.3  $\mu$ L，對應於 3.0 mm 孔中之濕血液體積) 摻入來源於空白替代基質之 DBS 萃取物中來製備後摻入型樣本。

【0102】 使用等體積之來自六名健康個體 (3 名男性及 3 名女性) 之匯集的全血來測試 C1-INH 活性之全血穩定性。在添加至 Whatman #903 蛋白質保存卡之前將樣本在 4°C 下儲存長達 7 天。相似地，將由匯集的全血製備之 DBS 樣本分別在 45°C 下儲存 3 天及在室溫下儲存 134 天以估量在運送及儲存條件下之穩定性。

#### (ix) 數據分析

【0103】 如實施例 1 中所述執行數據分析。簡言之，分析物比內部標準物之峰面積比率藉由 AB Sciex Analyst (1.6.3) 來確定。用峰面積比率及摻入之 C1-INH 的濃度，使用 SoftMax Pro 7.0 構建 4 參數邏輯校準曲線。基於以下方程式計算樣本濃度：

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (\text{方程式 1})$$

其中 y 為峰面積比率；x 為樣本濃度；A、B、C 及 D 為曲線擬合參數。另外，使用 Excel 計算平均值、準確度 (RE%)、標準差及相對標準差 (RSD%)。

#### 結果

##### 整體策略

【0104】 如圖 5 中所示開發 LC-MS/MS 檢定以量測來源於乾燥血液樣點之樣本中的酶反應產物 cbz-Lys。檢定由以下步驟組成：(1) 自 DBS 卡萃取

C1-INH；(2) 使 C1-INH 與過量 C1s 結合；(3) 使未結合之 C1s 與其受質反應；及 (4) 對酶反應產物 cbz-Lys 進行 LC-MS/MS 分析。在驗證前操作期間最佳化檢定條件，諸如 C1s 與其受質之相對濃度、C1s 與 fC1-INH 之間的結合時間及溫度、C1s 與其受質之間的酶反應時間及溫度以及 LC-MS/MS 條件。

### 校準基質及校準曲線

【0105】 由匯集的人類全血製備 C1-INH 耗盡之血液基質以便量測 C1-INH 活性低於正常對照之 HAE 患者中之 C1-INH 活性。C1-INH 為循環蛋白質且在離心以使紅血球離心沈降之後與血漿上清液保持在一起。隨後用 BSA 溶液補給紅血球以模擬原始真全血中之血漿蛋白質濃度。與相同體積之紅血球混合的 4.3% 之 BSA (43 mg/mL) 引起與原始真全血相似的黏度，如由濾紙中之相同樣點大小所展現。如圖 6A 及 6B 中所展示，C1-INH 之完全耗盡藉由來自替代基質及空白對照之相同分析物信號來確認，其意味著替代基質中不存在 fC1-INH 活性。相比之下，在匯集的健康血液 (圖 6C) 及摻有 500 mU/mL 之 C1-INH 的匯集的健康血液 (圖 6D) 中存在 C1-INH 依賴性信號衰減。

【0106】 圖 7 藉由繪製分析物信號對比摻入替代基質中之六個不同 C1-INH 濃度 (mU/mL) 的圖，使用四參數邏輯曲線擬合顯示典型校準曲線。曲線展示介於 100 至 1500 mU/mL 之可工作範圍。檢定驗證結果證明六點校準曲線符合預設準則：(1) 在每個濃度水平下，對於至少一半的校準劑而言相對誤差 (RE%) 應 $\leq$ 20%，除對於 LLOQ 及 ULOQ 校準劑，相對誤差 $\leq$ 25%以外；(2) 校準劑之總數量之 $\geq$ 75%必須包括於校準曲線中；(3) 驗證操作失敗應不超過連續兩次。在通過分析操作的 14 個中之 13 個，所有校準劑之平均操作間準確度範圍為-1.4%至 5.9% (表 4)。

表 4.校準結果之概述

標準物	標準物1 (100 mU/mL)		標準物2 (200 mU/mL)		標準物3 (300 mU/mL)		標準物4 (500 mU/mL)		標準物5 (1000 mU/mL)		標準物6 (1500 mU/mL)	
	量測之濃度 (mU/mL)	準確度偏差 (%)	量測之濃度 (mU/mL)	準確度偏差 (%)	量測之濃度 (mU/mL)	準確度偏差 (%)	量測之濃度 (mU/mL)	準確度偏差 (%)	量測之濃度 (mU/mL)	準確度偏差 (%)	量測之濃度 (mU/mL)	準確度偏差 (%)
操作編號1	98.4	-1.6	184	-8.0	284	-5.3	446	-10.8	887	-11.3	1490	-0.7
	104	4.0	213	6.5	321	7.0	567	13.4	1180	18.0	1850	23.3
操作編號2	88	-12.0	197	-1.5	283	-5.7	495	-1.0	1050	5.0	1250	-16.7
	108	8.0	207	3.5	312	4.0	514	2.8	1050	5.0	1450	-3.3
操作編號3	101	1.0	203	1.5	297	-1.0	498	-0.4	1050	5.0	1340	-10.7
	101	1.0	193	-3.5	309	3.0	492	-1.6	998	-0.2	1680	12.0
操作編號4	92.8	-7.2	201	0.5	301	0.3	489	-2.2	1070	7.0	1370	-8.7
	110	10.0	192	-4.0	310	3.3	492	-1.6	990	-1.0	1800	20.0
操作編號5	99.7	-0.3	184	-8.0	297	-1.0	497	-0.6	996	-0.4	1310	-12.7
	99.7	-0.3	217	8.5	302	0.7	503	0.6	1100	10.0	1460	-2.7
操作編號6	64.8	-35.2	191	-4.5	284	-5.3	460	-8.0	915	-8.5	n a	n a
	124	24.0	207	3.5	322	7.3	536	7.2	1210	21.0	n a	n a
操作編號7	97.8	-2.2	199	-0.5	287	-4.3	479	-4.2	989	-1.1	1300	-13.3
	105	3.0	199	-0.5	316	5.3	517	3.4	1060	6.0	1730	15.3
操作編號8	100	0.0	207	3.5	325	8.3	509	1.8	1120	12.0	1450	-3.3
	100	0.0	187	-6.5	291	-3.0	461	-7.8	1040	4.0	1360	-9.3
操作編號9	123	23.0	206	3.0	300	0.0	463	-7.4	1140	14.0	1350	-10.0
	73.7	-26.5	188	-6.0	315	5.0	507	1.4	1070	7.0	1370	-8.7
操作編號10	96.3	-3.5	182	-9.0	294	-2.0	430	-10.0	1050	5.0	1310	-12.7
	103	3.0	214	7.0	323	7.7	517	3.4	1140	14.0	1480	-1.3
操作編號11	105	5.0	202	1.0	324	8.0	477	-4.6	1100	10.0	1370	-8.7
	94.7	-5.3	194	-3.0	293	-2.3	485	-3.0	1100	10.0	1390	-7.3
操作編號12	108	8.0	200	0.0	299	-0.3	475	-5.0	963	-3.7	1370	-8.7
	91.6	-8.4	200	0.0	302	0.7	526	5.2	1070	7.0	1610	7.3
操作編號13	88.2	-11.8	195	-2.5	302	0.7	479	-4.2	1060	6.0	1390	-7.3
	111	11.0	207	3.5	302	0.7	493	-1.4	1120	12.0	1400	-6.7
操作編號14	94.6	-5.4	195	-2.5	292	-2.7	473	-5.4	1050	5.0	1390	-7.3
	106	6.0	202	1.0	319	6.3	504	0.8	1080	8.0	1430	-4.7
平均濃度 (mU/mL)	99.6		199		304		493		1059		1450	
平均偏差 (%)	-0.4		-0.6		1.3		-1.4		5.9		-3.3	
SD	12.1		9.2		13.1		26.7		72.4		157	
CV (%)	12.2		4.6		4.3		5.4		6.8		10.8	

### 檢定精確度及準確度

【0107】 使用於替代基質及原始真全血中製備之 QC 樣本評估檢定精確度及準確度。藉由將 fC1-INH 摻入替代基質中分別至 100 mU/mL 及 150 mU/mL 之最終濃度來製備 LLOQ QC 及低 QC。將匯集的全血用作低-中 QC，然而中、中-高及高 QC 樣本藉由將 fC1-INH 摻入匯集的全血中來製備。其標稱濃度為平均內源性 C1-INH 濃度 (518 mU/mL, n=18) 與摻入的 fC1-INH 之濃度的總和。如表 5 中所示，同日內精確度及準確度範圍為 4.4% 至 11.6% 及 -11.1% 至 -2.1%，且異日間精確度及準確度分別為 8.1% 至 13.1% 及 -10.3% 至 0.9%。

表 5. 同日內及異日間精確度及準確度之概述

QC 樣本			同日內 (n=6)			異日間 (n=18)		
QC 名稱	樣本基質	標稱濃度 (mU/mL)	量測之濃度 ± S.D. (mU/mL)	R.S.D. (%)	RE (%)	量測之濃度 ± S.D. (mU/mL)	R.S.D. (%)	RE (%)
LLOQ QC	替代基質	100	97.9 ± 10.4	10.6	-2.2	99.1 ± 9.40	9.5	0.9
低 QC		150	134 ± 5.3	4.0	-10.8	143 ± 13.1	9.2	-4.6
低-中 QC (EL)	匯集的全血	518	507 ± 54.5	10.8	-2.1	518 ± 53.1	10.3	N/A
中 QC (EL+200 mU/mL)		718	639 ± 73.9	11.6	-11.1	651 ± 52.7	8.1	-9.4
中-高 QC (EL+500 mU/mL)		1020	991 ± 44.1	4.4	-2.8	915 ± 75.0	8.2	-10.3
高 QC (EL+800 mU/mL)		1320	1187 ± 118	10.0	-10.1	1250 ± 163	13.1	-5.5

### 血容比水平之影響

【0108】 充分記載了全血之血容比水平影響血液在濾紙中之稀釋且由此影響 DBS 樣點大小，導致檢定偏差 (1-3,6,7)。隨著血容比水平提高，DBS 樣本之樣點面積減小。視性別及年齡而定，全血中之血容比水平在 28% 至 67% 範圍內 (7)。在四個血容比水平 25%、45%、60% 及 75% 下探究血容比對檢定效能

之影響，其中 45%血容比水平用作對照。fC1-INH 活性展示在乾燥血液樣點中與血容比水平之線性相關性（表 6）。30%-60%之間的血容比水平應對 fC1-INH 活性量測具有最小影響（RE<20%）。

表 6.血容比水平對 DBS 中量測之 fC1-INH 活性的影響

樣本標識	血容比水平 (%)	量測之濃度± S.D. (mU/mL, n=4)	理論濃度 (mU/mL)	R.S.D. (%)	RE%
HMN13491	25	572 ± 76.1	851	13.3	-32.8
	45	624 ± 32.3	624	5.2	0
	60	463 ± 81.8	454	17.7	2.00
	75	406 ± 16.6	284	4.1	43.0
HMN13492	25	793 ± 74.4	1055	9.4	-24.8
	45	774 ± 95.3	774	12.3	0
	60	643 ± 42.5	563	6.6	14.2
	75	502 ± 21.1	352	4.2	42.6
HMN13493	25	835 ± 139	1189	16.7	-29.8
	45	872 ± 123	872	14.1	0
	60	582 ± 50.9	634	8.7	-8.20
	75	478 ± 27.0	396	5.6	20.7
HMN13494	25	766 ± 83.6	949	10.9	-19.3
	45	696 ± 66.1	696	9.5	0
	60	587 ± 48.0	506	8.2	16.0
	75	497 ± 34.2	316	6.9	57.3

### C1-INH 活性之打孔位置

【0109】 基於 DBS 之檢定中的另一關注點為打孔位置對分析物量測之影響（1, 6, 8）。為檢驗 DBS 卡上之打孔位置對 C1-INH 活性之影響，自同一個體之四個樣點收集來自中心及外周之孔的總共 18 份複製樣本且分析低 QC 及中高 QC 樣本。精確度及準確度均在 15%內，意味著打孔位置並不影響 C1-INH 活性量測（表 4）。

### 萃取效率

【0110】 使用於替代基質中製備之 QC 估量 C1-INH 之萃取效率。在 100、600 及 1000 mU/mL 之 QC 濃度下平均萃取效率分別為 48.8%、65.9%及 58.2%(表

7)。將校準曲線用於樣本測試期間之每次操作，萃取效率之偏差將不影響檢定準確度。

表 7.DBs 樣本中 C1-INH 之萃取效率

濃度 (mU/mL)	萃取效率± S.D. (% , n=4)	R.S.D. (%)
100	48.8 ± 4.92	10.1
600	65.9 ± 3.93	6.0
1000	58.2 ± 3.45	5.9

#### 全血及 DBS 中之 fC1-INH 穩定性

【0111】 在全血中估量 fC1-INH 之穩定性。先前報告證明 fC1-INH 在室溫下在患者及健康個體中均穩定長達三天 (9)。在 4°C 下儲存七天之後，匯集的健康血液中之 fC1-INH 活性具有最小變化 (表 8)。為了測試 DBS 中之 fC1-INH 穩定性，在室溫及 45°C 下將 QC 對照放入具有乾燥劑包裝之密閉袋子中。在來自各卡之不同孔中量測 C1-INH 活性且在 45°C 下儲存 3 天之後及在室溫下儲存 134 天時展示最小損失 (<15%) (表 8)。此等結果證明 fC1-INH 可在環境溫度下在 DBS 中運送及儲存而不損失活性。

表 8.在不同溫度下儲存之全血及 DBS 中的 fC1-INH 活性之穩定性

基質	儲存溫度 (°C)	儲存天數	量測之濃度± S.D. (mU/mL)	R.S.D. (%)	RE (%)
全血	4°C	0	489±54.2 (n=4)	11.1	N/A
		5	497±64.0 (n=4)	12.9	1.6
		7	473±33.8 (n=4)	7.2	-3.3
DBS	室溫	0	512±56.2 (n=18)	11	N/A
		134	441±53.9 (n=6)	12.2	-13.8
	室溫 45°C	0	407±13.6 (n=6)	3.3	N/A
		3	383±36.8 (n=6)	9.6	-5.8

【0112】 在於 4°C 下放入自動取樣器中兩天之後再注入經處理樣本以評估再注入穩定性。結果展示精確度及準確度符合預定接受準則 (表 9)。另外，分析物殘留不可偵測 (數據未展示)。

表 9.再注入穩定性測試之概述

QC 取樣器			同日內 (n=6)		
樣本名稱	樣本基質	標稱濃度 (mU/mL)	量測之濃度± S.D. (mU/mL)	R.S.D. (%)	RE (%)
低 QC	紅細胞基質	150	145 ± 13.9	9.6	-3.1
低-中 QC (匯集的全血, EL)	匯集的全血	518	488 ± 44.3	9.1	-5.7
中 QC (EL+200 mU mL)		718	645 ± 52.8	8.2	-10.2
中-高 QC (EL+500 mU/mL)		1020	867 ± 48.5	5.6	-15.0
高 QC (EL+800 mU-mL)		1320	1200 ± 74.4	6.2	-8.8

#### 來自健康及 HAE 個體之 DBS 樣本之分析

【0113】 使用經驗證檢定，在自 103 名健康個體及 24 名 HAE 患者 (9 名男性及 15 名女性) 收集之 DBS 樣本中量測 fC1-INH 活性且結果呈現於圖 8 中。對於健康個體組，fC1-INH 活性範圍為 311 至 1090 mU/mL，平均活性及標準差 (SD) 分別在 573 及 135 mU/mL。儘管如此，除一個個體之 C1-INH 為 158 mU/mL 以外，所有測試的 HAE 個體之 C1-INH 活性低於 LLOQ (100 mU/mL)。確立 303 mU/mL 之截斷值 (平均值-2xSD)，其能夠完全區分健康個體與 HAE 個體。

#### 討論

【0114】 C1-INH 用以調節廣泛範圍的抑制性生物活性，包括補體、接觸、凝血及纖維蛋白溶解系統 (10-12)。作為激肽釋放酶-激肽級聯中之三種酶 (因子 XIIa、因子 XIIf 及血漿激肽釋放素) 的關鍵抑制子，正常 fC1-INH 量防止緩激肽 (誘導 HAE 發作之促發炎介體) 的過度產生。缺乏 fC1-INH 活性導致接觸系統之復發性活化、生成過量血漿激肽釋放素 (pKal) (一種活性蛋白水解酶)，該血漿激肽釋放素隨後分解高分子量激肽原 (high-molecular-weight kininogen，

HMWK) 以釋放緩激肽 (13-15)。當前，在 C1-INH SERPING1 基因中已識別超過 450 個突變且許多與 HAE 患者中之 fC1-INH 缺乏相關 (16)。

**【0115】** 儘管存在不同類型之 HAE，但其特徵均在於缺乏 C1-INH 功能。典型地，HAE 患者中之 fC1-INH 量在正常值之 5-30%之間，且減弱的 C1-INH 活性用作 HAE 診斷之最重要實驗室參數 (9)。fC1-INH 活性之習知檢定藉助於 C1s 與其人工受質 Z-Lys-SBzl·HCl 之間反應以產生 cbz-Lys 及硫基甲基苯來間接量測 fC1-INH 活性。在用 5,5'-二硫基雙-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 衍生化之後藉由發色檢定來量測硫基甲基苯 (9)。內源性或摻入的 C1-INH 之存在將抑制酶反應，因此，反應產物之形成與 C1-INH 活性成反比。儘管習知檢定在血漿或血清樣本中有力區分健康個體與 HAE 個體，但由於全血中紅血球之檢定干擾，其在 DBS 中之使用受限制。LC-MS/MS 檢定相比於習知發色檢定擁有獨特優點。首先，發色檢定係基於反應之兩個步驟，然而 LC-MS/MS 檢定量測 C1s 反應之直接產物，因此檢定偏差可降低。其次，在檢定中使用內部標準物 (IS) 亦有助於校正樣本製備及分析期間的分析偏差。第三，於不含 C1-INH 之替代基質中製備的校準曲線及 QC 包括於每次操作中以進一步提高檢定之準確度及再現性。考慮到健康個體中 C1-INH 活性之較寬範圍、HAE 患者中之受限 C1-INH 活性偏移(正常活性之 5-30%) 及酶動力學反應之狹窄範圍，最小化檢定偏差可為準確量測 C1-INH 活性之關鍵因素。

**【0116】** 在酶活性檢定中，分析物之校準曲線通常在純淨緩衝溶液而非原始真基質中製備，且檢定效能藉由 QC 樣本來監測。儘管此法較簡單，但其不能容易地應用於 C1-INH 活性量測，因為酶反應進行地太快速，使得反應條件之輕微偏移將影響分析結果且由此影響患者之準確診斷。在此等研究中採用已在生物標記物檢定中之校準劑及 QC 之製備中廣泛用作含有內源性分析物之原始真基質的「替代基質」之概念 (15)。替代基質應耗盡分析物但在消化效率、電離作用及萃取產率方面接近原始真基質。將來源於全血之替代基質用於製備校準

曲線及 QC 對準確評估 C1-INH 活性較低的患者樣本中之酶反應至關重要。用此法，達到 100 至 1500 mU/mL 之間的檢定範圍。此外，自替代基質及原始真全血中製備之 QC 樣本均達成極好的準確度及精確度，表明檢定條件下兩種基質之並行性。

【0117】 本文所述之 LC-MS/MS 檢定展示小於 15% 之平均同日内及異日間變化及可忽略的樣本之間的殘留。另外，C1-INH 活性量測與 DBS 內之打孔位置無關，對 DBS 中之一些其他分析物而言，情況可能並非如此 (1)。然而，檢定準確度可能受血容比水平影響，且在小於 30% 或超過 60% 之血容比水平的情況下，解釋來自樣本之測試結果應多加注意。

【0118】 在樣本運送及儲存期間在 DBS 中具有穩定的分析物量較重要。全血中之 C1-INH 在 4°C 下穩定 7 天。在 DBS 中，當在 45°C 下儲存時穩定長達 3 天且當在室溫下儲存時穩定長達 134 天。即使在發展中國家，此對於樣本收集、運送至集中實驗室及實驗室測試及再測試之全部持續時間而言足夠。

【0119】 在 103 名健康個體中量測之 C1-INH 活性展示平均活性為 573 mU/mL 且標準差為 135 mU/mL 之常態分佈。在 24 名 HAE 患者中，23 名展示 <100 mU/mL C1-INH 活性，且具有最高 C1-INH 活性 158 mU/mL 之 HAE 樣本對應於平均正常活性之 27.6%。數據支持來自健康個體之樣本與對應的來自患有 HAE 之患者之樣本之間的明確區別。

【0120】 總之，本文描述用於 DBS 樣本中之 fC1-INH 活性的穩健檢定。該檢定提供診斷 HAE 患者之優良再現性及準確度。簡單樣本收集及長期運送及儲存穩定性擴展診斷性測試之可用性，尤其在進入配備充分之臨床實驗室受限制或不能進入配備充分之臨床實驗室的地方。該檢定展示在基本上於世界範圍內改變 HAE 診斷之算法的極大潛力。

## 參考文獻

1. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova KA, Muhl A, Heinze G, 等人  
Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006;373:27-31.
2. De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Muhl A, Orsini JJ, 等人  
Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 2009;55:158-64.
3. de Vries R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, 等人  
The effect of hematocrit on bioanalysis of dbs: Results from the ebf dbs-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013;5:2147-60.
4. Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, 等人  
Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res* 2006;23:312-28.
5. McDade TW. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *Am J Hum Biol* 2014;26:1-9.
6. Timmerman P, White S, Globig S, Ludtke S, Brunet L, Smeraglia J. Ebf recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis* 2011;3:1567-75.
7. Denniff P, Spooner N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis* 2010;2:1385-95.
8. Cobb Z, de Vries R, Spooner N, Williams S, Staelens L, Doig M, 等人  
In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: Results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013;5:2161-9.
9. Wagenaar-Bos IG, Drouet C, Aygoren-Pursun E, Bork K, Bucher C, Bygum A, 等人  
Functional C1-inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: Assay

evaluation and recommendations. *J Immunol Methods* 2008;338:14-20.

10. Bork K, Davis-Lorton M. Overview of hereditary angioedema caused by C1-inhibitor deficiency: Assessment and clinical management. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013;45:7-16.

11. Csuka D, Veszeli N, Varga L, Prohaszka Z, Farkas H. The role of the complement system in hereditary angioedema. *Mol Immunol* 2017;89:59-68.

12. Ratnoff OD, Pensky J, Ogston D, Naff GB. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and the C'1r subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor. *J Exp Med* 1969;129:315-31.

13. Nzeako UC, Frigas E, Tremaine WJ. Hereditary angioedema: A broad review for clinicians. *Arch Intern Med* 2001;161:2417-29.

14. Bernstein JA, Moellman J. Emerging concepts in the diagnosis and treatment of patients with undifferentiated angioedema. *Int J Emerg Med* 2012;5:39.

15. Zhang G, Sexton DJ, Faucette RR, Qiu Y, Wu J. 2d-lc-ms/ms to measure cleaved high-molecular-weight kininogen in human plasma as a biomarker for C1-INH-HAE. *Bioanalysis* 2017;9:1477-91.

16. Johnsrud I, Kulseth MA, Rodningen OK, Landro L, Helsing P, Waage Nielsen E, Heimdal K. A nationwide study of norwegian patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency identified six novel mutations in SERPING1. *PLoS One* 2015;10:e0131637.

17. Maurer M, Magerl M, Ansotegui I, Aygoren-Pursun E, Betschel S, Bork K, 等人 The international wao/eaaci guideline for the management of hereditary angioedema-the 2017 revision and update. *Allergy* 2018;73:1575-96.

18. Li HH, Busse P, Lumry WR, Frazer-Abel A, Levy H, Steele T, 等人

Comparison of chromogenic and ELISA functional C1 inhibitor tests in diagnosing hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3:200-5.

19. Ganz N, Singrasa M, Nicolas L, Gutierrez M, Dingemans J, Dobelin W, Glinski M. Development and validation of a fully automated online human dried blood spot analysis of bosentan and its metabolites using the sample card and prep db system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;885-886:50-60.

20. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadova KA, Muhl A, Heinze G, 等人 Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006;373:27-31.

21. Matern D, Oglesbee D, Tortorelli S. Newborn screening for lysosomal storage disorders and other neuronopathic conditions. *Dev Disabil Res Rev* 2013;17:247-53.

22. Mokhtariye A, Hagh-Nazari L, Varasteh AR, Keyfi F. Diagnostic methods for lysosomal storage disease. *Rep Biochem Mol Biol* 2019;7:119-28.

23. Zhang XK, Elbin CS, Chuang WL, Cooper SK, Marashio CA, Beauregard C, Keutzer JM. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2008;54:1725-8.

24. Olivova P, van der Veen K, Cullen E, Rose M, Zhang XK, Sims KB, 等人 Effect of sample collection on alpha-galactosidase an enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2009;403:159-62.

## 其他實施方式

【0121】 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服務相同、等效或類似目的之替代性特徵替換。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。

**【0122】** 根據以上描述，所屬領域中具有通常知識者可易於確定本發明之基本特徵，且在不脫離本發明之精神及範疇的情況下可對本發明作出各種改變及修改以使其適應各種用途及條件。因此，其他實施方式亦屬於申請專利範圍內。

### 等效物

**【0123】** 儘管本文中已描述及說明若干發明性實施方式，但所屬領域中具有通常知識者將容易設想多種其他方法及/或結構來執行本文所描述之功能及/或獲得本文所描述之結果及/或一或多種優點，且如此變化及/或修改中之每一者視為屬於本文所描述之本發明實施方式之範疇內。更一般而言，所屬領域中具有通常知識者將容易地理解，本文所描述之所有參數、尺寸、材料及組態意欲為例示性且實際參數、尺寸、材料及/或組態將視使用發明性教示內容之一或多種特定應用而定。所屬領域中具有通常知識者將認識到或使用不多於常規實驗便能夠確定本文所描述之特定發明性實施方式的許多等效物。因此，應瞭解前述實施方式僅藉助於實例呈現及在所附申請專利範圍及其等效物之範疇內，發明性實施方式可以與特定描述及所主張不同之方式實踐。本文之揭示內容之發明性實施方式係關於本文所述之各個別特徵、系統、物品、材料、套組及/或方法。另外，若如此特徵、系統、物品、材料、套組及/或方法相互間無不一致，則兩種或超過兩種如此特徵、系統、物品、材料、套組及/或方法之任何組合均包括於本文之揭示內容之發明性範疇內。

**【0124】** 如本文中所定義及使用之所有定義應理解為相對於辭典定義、以引用之方式併入的文獻中的定義及/或所定義術語之普通含義，以本文為準。

**【0125】** 本文所揭示之全部參考文獻、專利及專利申請案根據各自所引述

之主題以引用之方式併入，該主題在一些情況下可涵蓋文件之全部內容。

**【0126】** 除非指示截然相反，否則如本文在說明書及申請專利範圍中所用之不定冠詞「一 (a/an)」應理解為意謂「至少一個」。

**【0127】** 如本文在說明書及申請專利範圍中所用之片語「及/或」應理解為意謂如此結合之要素的「任一者或兩者」，亦即，在一些情況下結合地存在且在其他情況下未結合地存在的要素。使用「及/或」列出之多個要素應以相同方式解釋，亦即，如此結合之「一或多個」要素。可視情況存在除了藉由「及/或」條項所特定識別之要素以外的其他要素，無論與特定識別之彼等要素相關或不相關。因此，作為一非限制性實例，提及「A 及/或 B」在結合諸如「包含」等開放式措辭使用時，在一個實施方式中，可僅指 A（視情況包括除 B 以外之要素）；在另一實施方式中，可僅指 B（視情況包括除 A 以外之要素）；在又一實施方式中，可指 A 及 B 兩者（視情況包括其他要素）；等。

**【0128】** 如本文在說明書及申請專利範圍中所用，「或」應理解為具有與上文所定義之「及/或」相同的含義。舉例而言，當分開清單中之項目時，「或」或「及/或」應解釋為包括性的，亦即，包括一些或一系列要素及（視情況）其他未列出項目的至少一個以及多於一個。僅指示截然相反的術語，諸如「中之僅一者」或「中之恰好一者」或當用於申請專利範圍中時「由……組成」，將指包括一些或一系列要素中之恰好一個要素。一般而言，當置於諸如「任一」、「中之一者」、「中之僅一者」或「中之恰好一者」的排他性術語之前時，如本文所用之術語「或」應僅解釋為指示排他性替代方案（亦即「一者或另一者但非二者皆」）。當用於申請專利範圍中時，「主要由……組成」應具有如其在專利法律領域中所使用之普通含義。

**【0129】** 如本文在說明書及申請專利範圍中所用，關於一系列一或多個要素之片語「至少一個」應理解為意謂由要素之清單中之任何一或多個要素中選出的至少一個要素，但未必包括要素之清單內具體列出的每一及每個要素中之至

少一者，且未必排除要素之清單中之要素的任何組合。此定義亦允許可視情況存在除片語「至少一個」所指的要素之清單內具體識別的要素以外的要素，而無論與具體識別的彼等要素相關或不相關。因此，作為一非限制性實例，「A 及 B 中之至少一者」（或等效地「A 或 B 中之至少一者」或等效地「A 及/或 B 中之至少一者」）在一個實施方式中可指至少一個（視情況包括多於一個）A 而不存在 B（且視情況包括除了 B 以外的要素）；在另一實施方式中，指至少一個（視情況包括多於一個）B 而不存在 A（且視情況包括除了 A 以外的要素）；在又一實施方式中，指至少一個（視情況包括多於一個）A 及至少一個（視情況包括多於一個）B（且視情況包括其他要素）；等等。

**【0130】** 亦應理解，除非指示截然相反，否則在本文所主張之包括多於一個步驟或操作之任何方法中，該方法之步驟或操作之次序無需侷限於敘述該方法之步驟或操作之順序。

#### **【符號說明】**

無

## 【發明申請專利範圍】

**【請求項1】** 一種用於測定樣本中功能性 C1-酯酶抑制子（functional C1-esterase inhibitor，fC1-INH）之量之方法，該方法包含：

- (i) 將來自個體之血液樣本點樣於支撐構件上；
- (ii) 將該支撐構件上之該血液樣本乾燥以形成乾燥血液樣點；
- (iii) 自來自 (ii) 之該乾燥血液樣點萃取蛋白質；及
- (iv) 量測 (iii) 中所萃取之蛋白質中的 fC1-INH 之量。

**【請求項2】** 請求項 1 之方法，其中量測 fC1-INH 之量包含

- (a) 將所萃取蛋白質與補體組分 1s (C1s) 及 C1s 受質一起培育以產生 C1s 受質產物；
- (b) 量測步驟 (a) 中所產生之 C1s 受質產物之量；及
- (c) 基於步驟 (b) 中所量測的該 C1s 受質產物之量來測定該乾燥血液樣點中的 fC1-INH 之量。

**【請求項3】** 如請求項 2 之方法，其中步驟 (a) 藉由將該等所萃取蛋白質與該 C1s 及該 C1s 受質一起培育以產生反應混合物來執行。

**【請求項4】** 如請求項 2 之方法，其中步驟 (b) 之量測步驟藉由液相層析-質譜法執行。

**【請求項5】** 如請求項 2 至 4 中任一項之方法，其中該 C1s 受質為 N<sup>α</sup>-苯甲氧羰基-Lys-苯甲硫醇酯且該 C1s 產物為 N<sup>α</sup>-苯甲氧羰基-L-離胺酸 (cbz-Lys)。

**【請求項6】** 如請求項 1 之方法，其中 (iii) 之萃取藉由用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) /PBS 緩衝液培育該乾燥血液樣點至少 3 小時來執行。

**【請求項7】** 如請求項 1 之方法，其中該支撐構件為濾紙。

**【請求項8】** 如請求項 1 之方法，其中步驟 (ii) 之乾燥在室溫下執行至少 3 小時。

【請求項9】 如請求項 1 之方法，其中該血液樣本為全血樣本。

【請求項10】 如請求項 1 之方法，其中個體為人類個體。

【請求項11】 如請求項 10 之方法，其中該個體患有遺傳性血管水腫 (hereditary angioedema, HAE)、疑似患有 HAE、或具有患有 HAE 之風險。

【請求項12】 如請求項 11 之方法，其中該 HAE 為 I 型 HAE 或 II 型 HAE。

【請求項13】 如請求項 1 之方法，其進一步包含確定該個體是否患有 C1-INH 缺乏介導之病症，其中與對照相比減小之 fC1-INH 產物之量指示該個體患有該 C1-INH 缺乏介導之病症。

【請求項14】 如請求項 1 之方法，其進一步包含基於 fC1-INH 之量識別用於該個體之適合治療。

【請求項15】 如請求項 2 之方法，其進一步包含基於步驟 (c) 中所測定的 fC1-INH 之量和對照量比較，將該個體識別為進行該疾病之治療的候選者，其中該對照量為自健康個體之樣本中取得的 fC1-INH 之量。

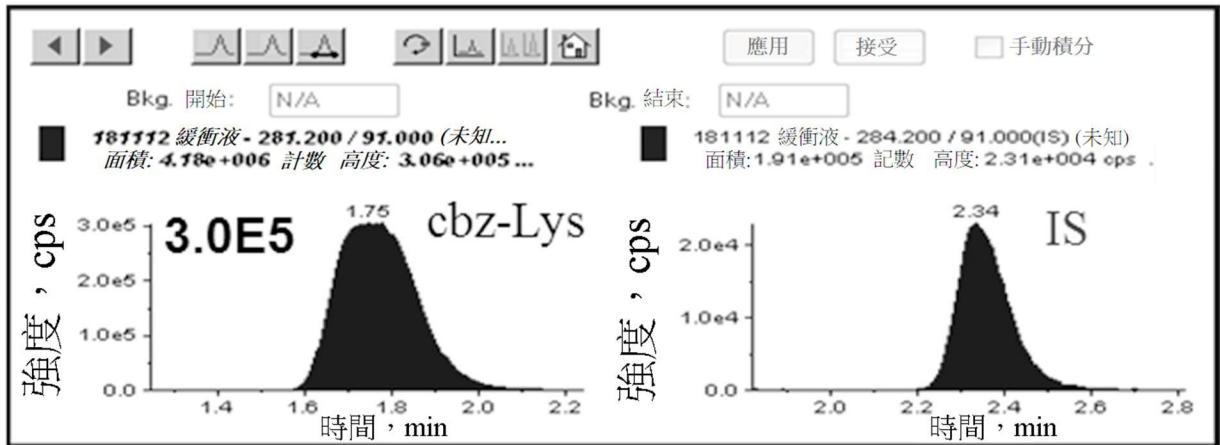
【請求項16】 如請求項 2 之方法，其中若根據步驟 (c) 所測定的 fC1-INH 的量與對照量相比後，該個體被識別為具有 C1-INH 缺乏介導之病症之風險或患有該病症，對該個體施用治療劑，其中該對照量為自健康個體之樣本中取得的 fC1-INH 量，且所述治療劑為艾卡拉肽 (ecallantide)、拉那蘆單抗 (lanadelumab)、艾替班特 (icatibant) 或人類血漿源性 C1 酯酶抑制子。

【請求項17】 如請求項 13-16 中任一項之方法，其中該 C1-INH 缺乏介導之病症為遺傳性血管水腫 (HAE)。

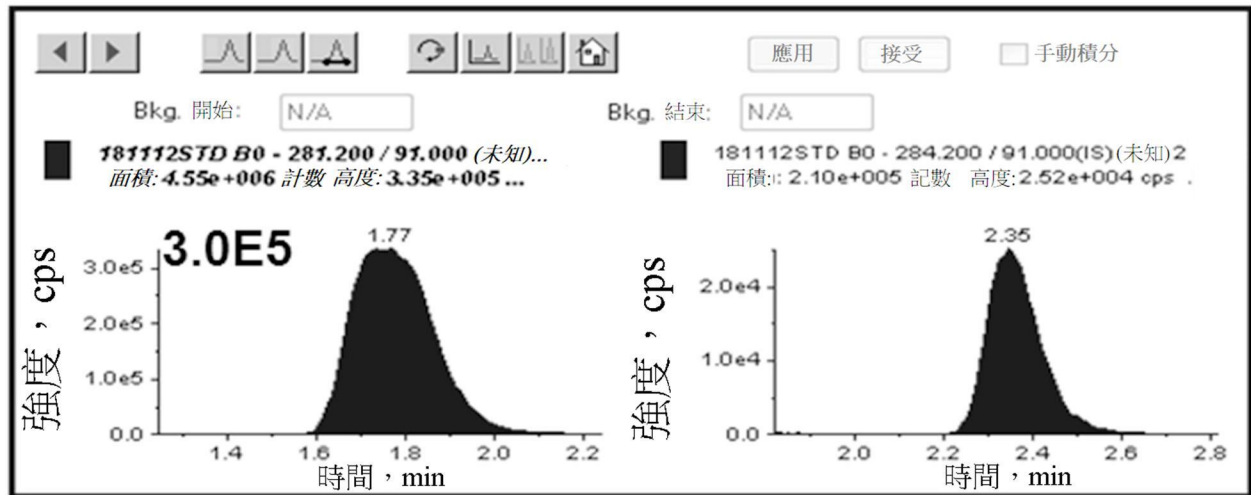
【請求項18】 如請求項 17 之方法，其中該 HAE 為 I 型 HAE 或 II 型 HAE。



1. 緩衝液對照



2. 紅血球+BSA緩衝液對照



3. 對照全血樣本

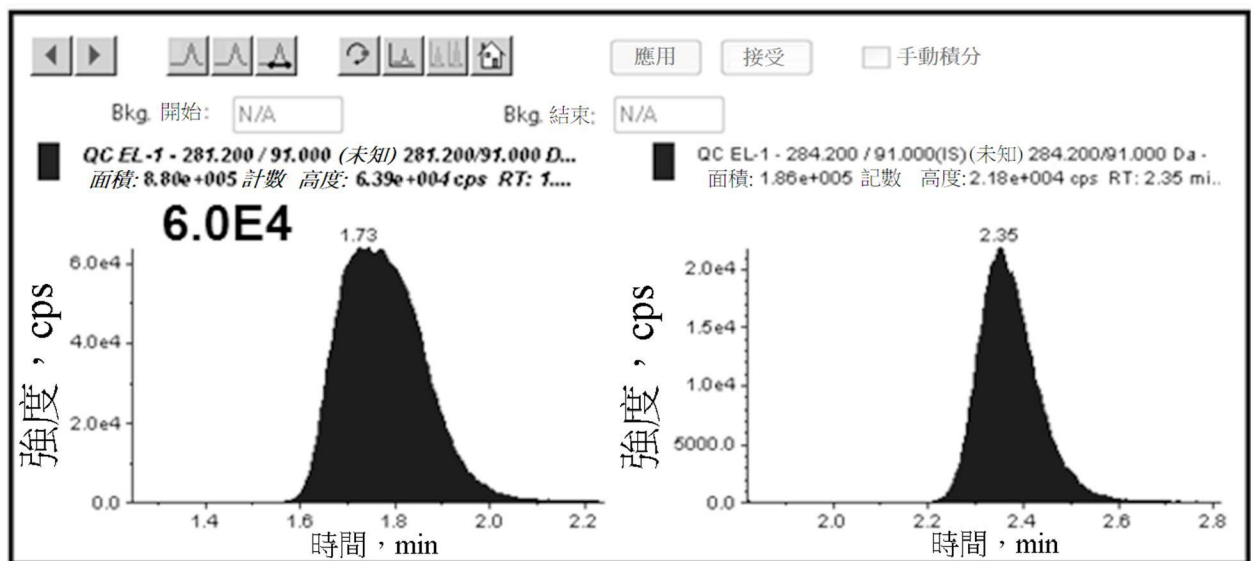


圖3

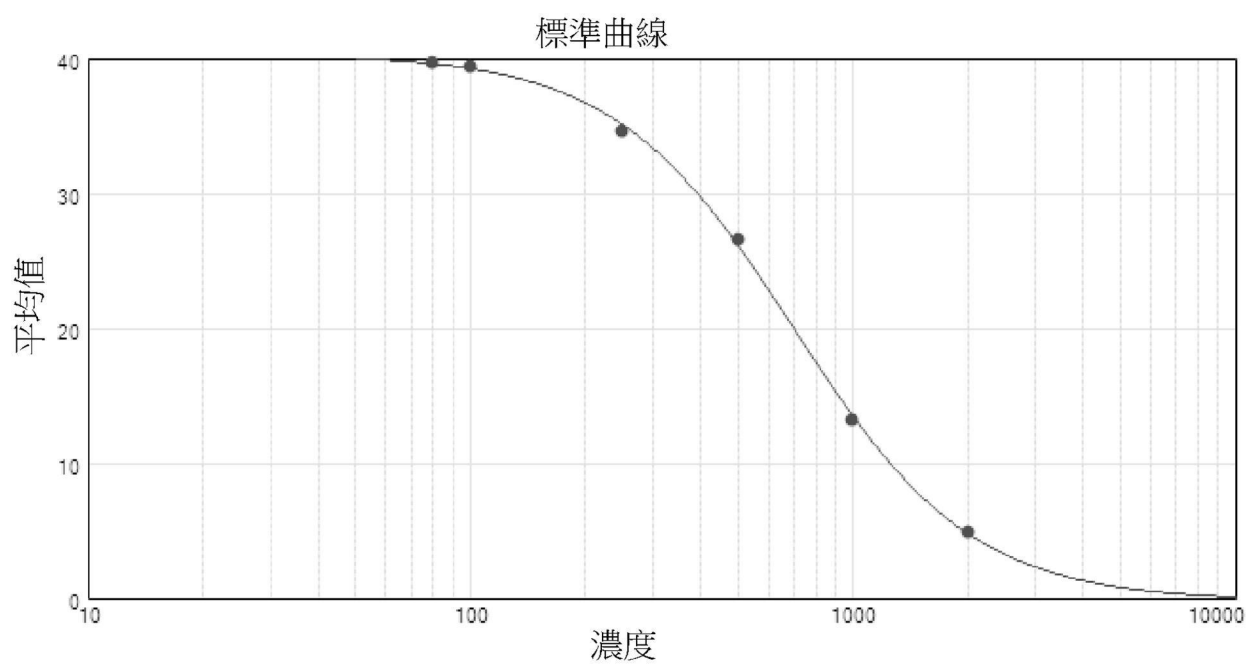


圖4

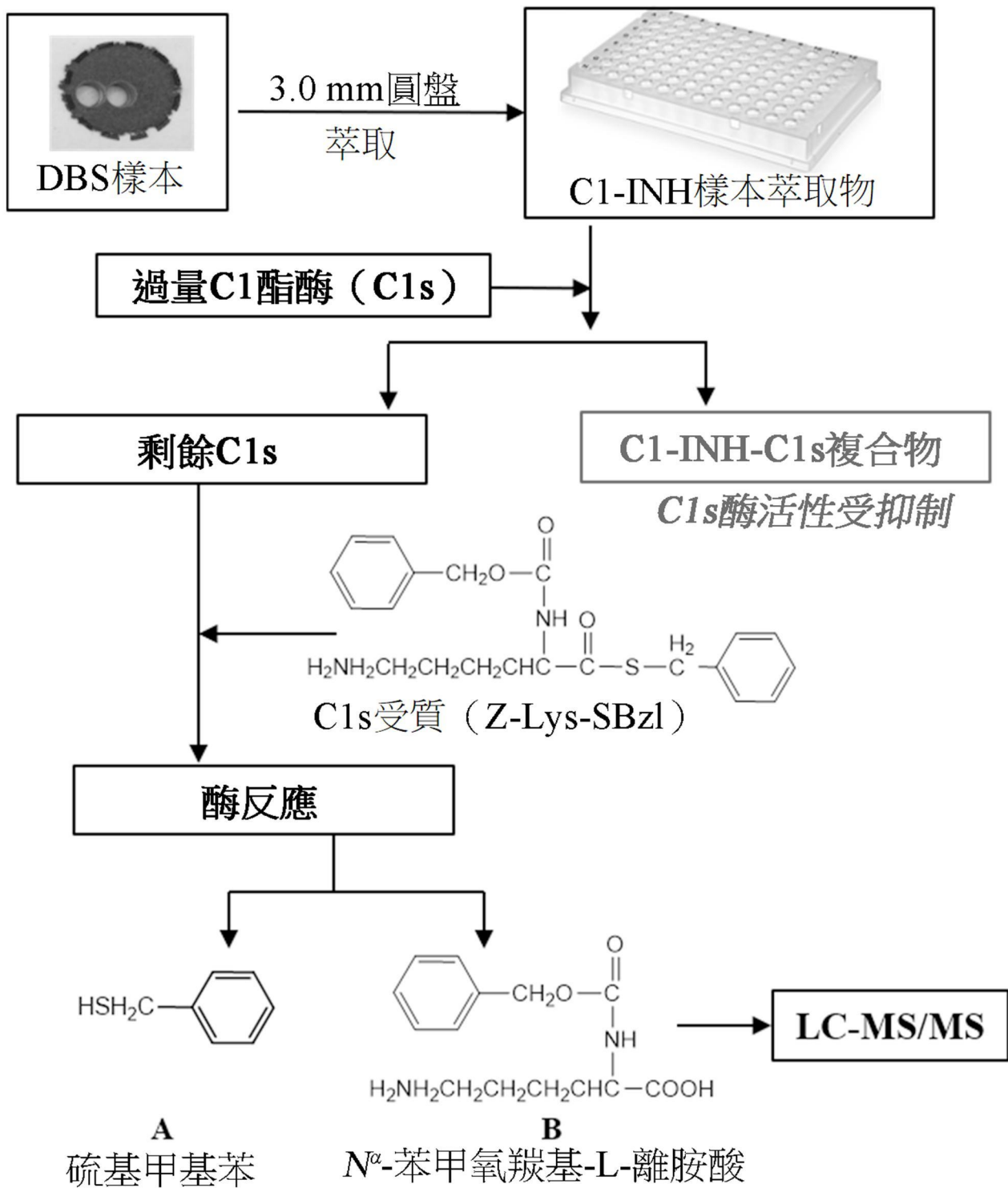
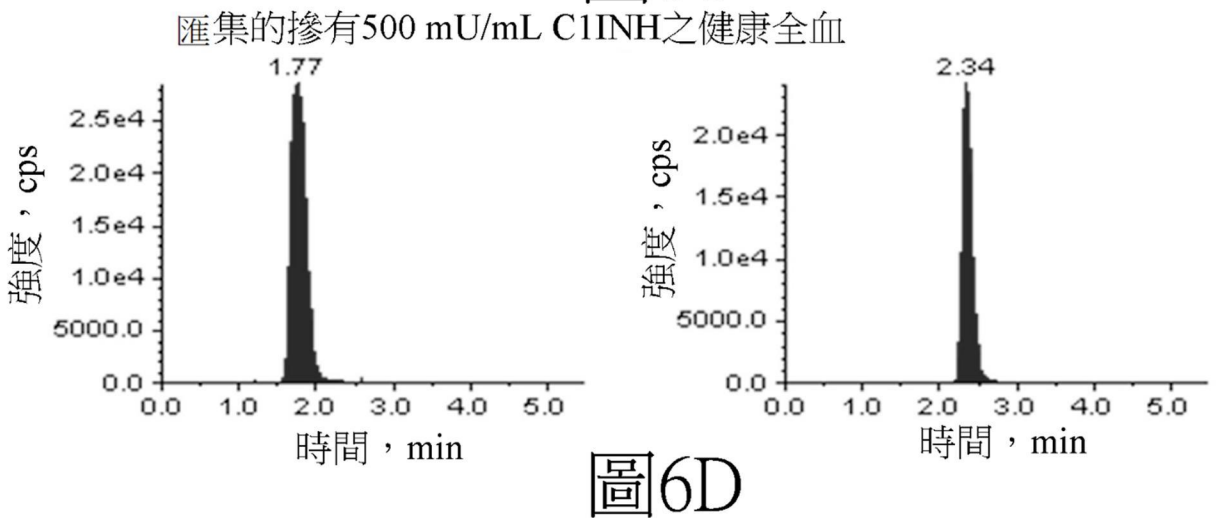
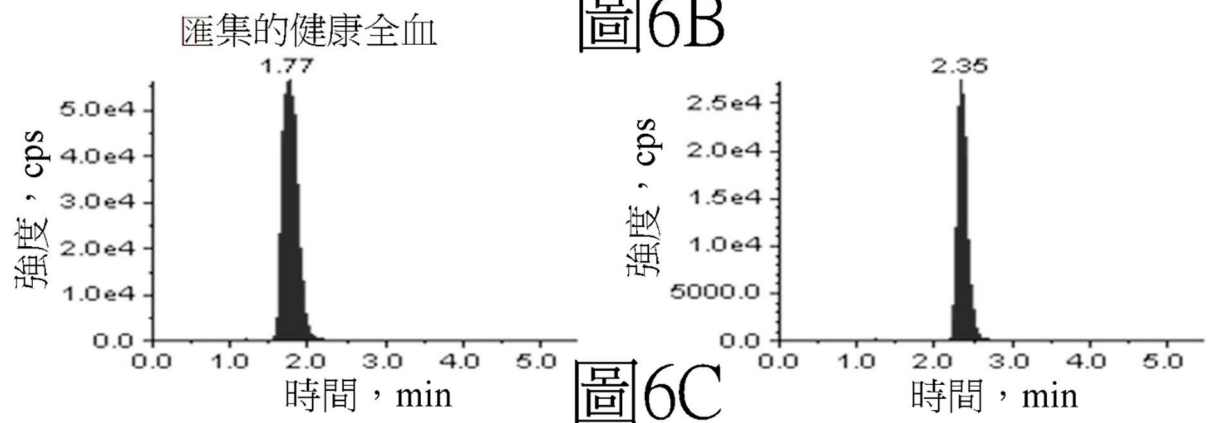
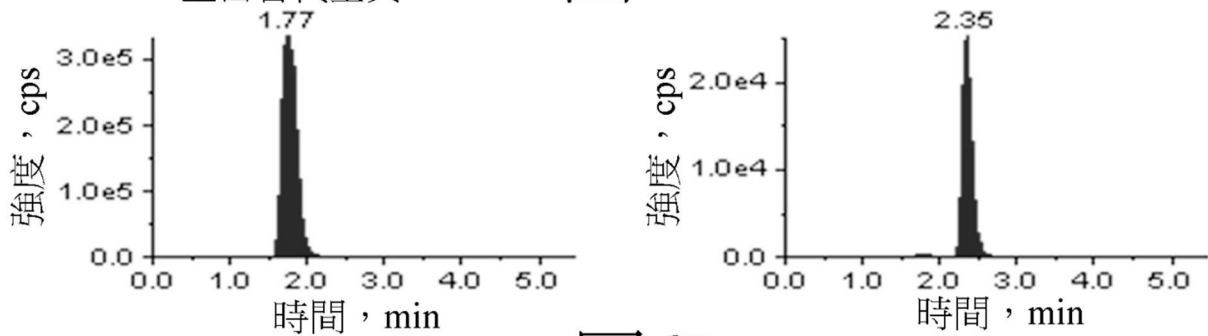
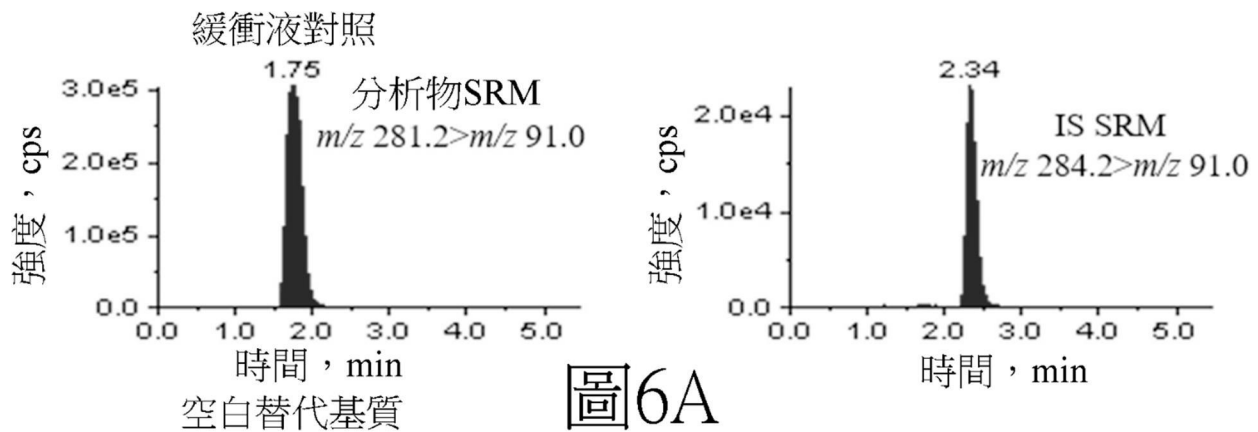


圖5



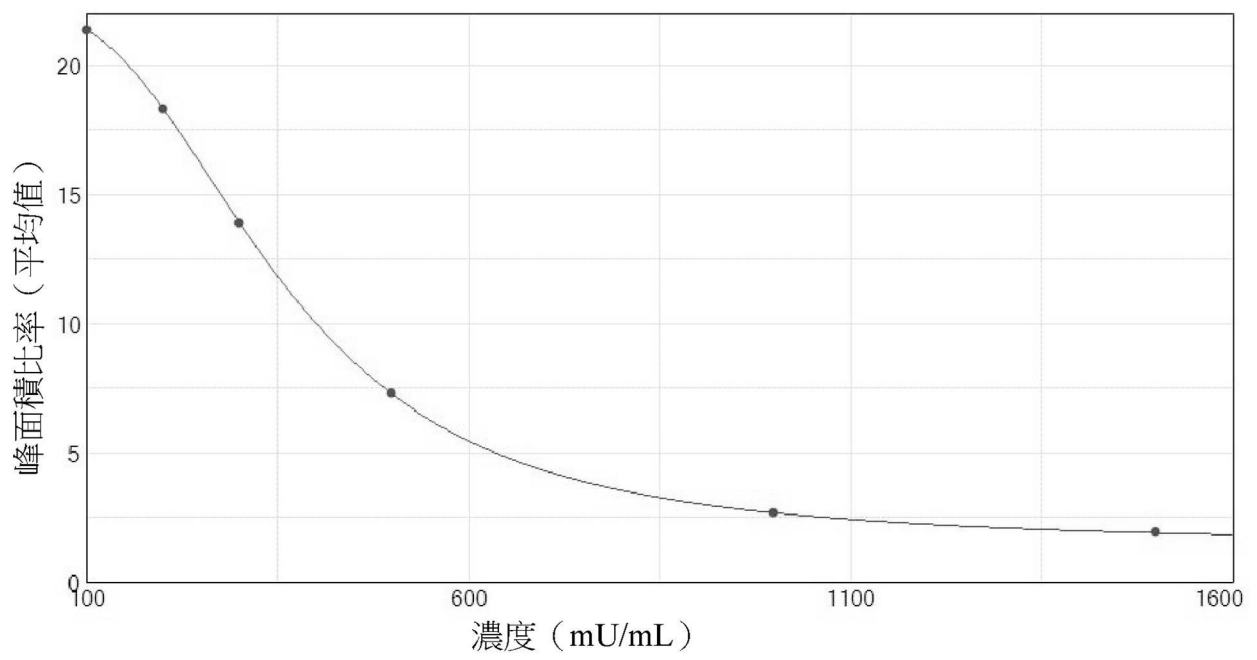


圖7

健康個體及HAE患者中之fc1-INH量

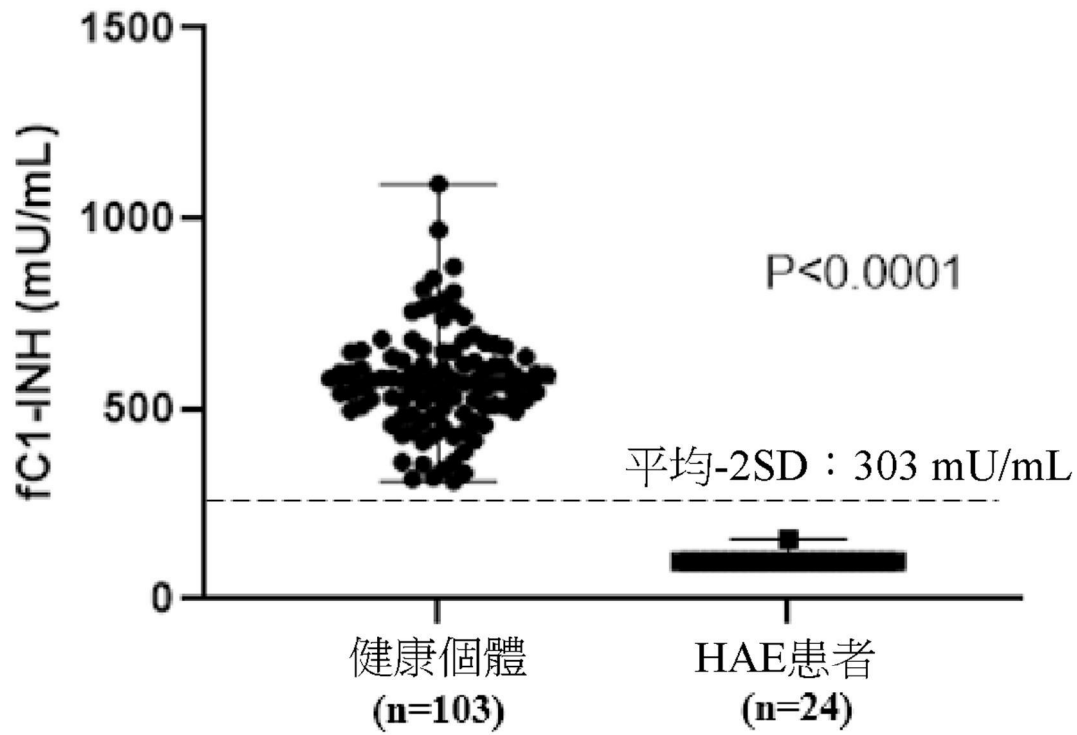


圖8

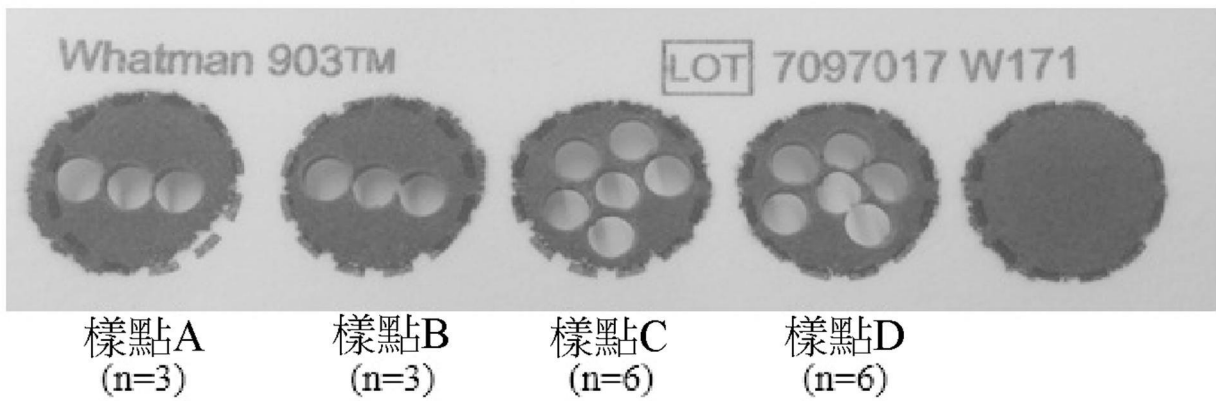


圖9