



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103180733 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201180051819. 5  
 (22) 申请日 2011. 08. 31  
 (30) 优先权数据  
 2010-193213 2010. 08. 31 JP  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2013. 04. 26  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/JP2011/069734 2011. 08. 31  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02012/029837 JA 2012. 03. 08  
 (73) 专利权人 协和梅迪克斯株式会社  
 地址 日本东京  
 (72) 发明人 鹈泽耕治 铃木惠美子 池田和幸  
 守田和树  
 (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
 72002  
 代理人 白丽 陈建全

(51) Int. Cl.  
 G01N 33/53(2006. 01)  
 G01N 33/543(2006. 01)  
 (56) 对比文件  
 CN 1639193 A, 2005. 07. 13,  
 CN 1667413 A, 2005. 09. 14,  
 CN 1928560 A, 2007. 03. 14,  
 JP 2005062087 A, 2005. 03. 10,  
 JP 2007178356 A, 2007. 07. 12,  
 JP 2008017790 A, 2008. 01. 31,  
 US 2010112727 A1, 2010. 05. 06,  
 WO 9407139 A1, 1994. 03. 31,

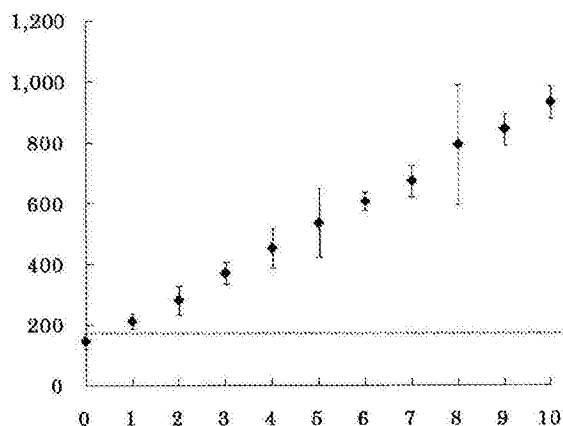
审查员 周洋

权利要求书1页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称  
 成纤维细胞生长因子-23的测定方法及测定试剂

(57) 摘要

本发明提供试样中的成纤维细胞生长因子-23 (FGF-23)的测定方法。该测定方法的特征在于,包含以下工序:(1)使试样中的 FGF-23 在水性介质中和磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段以及 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应,从而在磁性粒子上产生由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体的工序;(2)利用磁力聚集工序(1)后的反应混合物中的磁性粒子,从而将通过磁力聚集的磁性粒子与除其之外的成分分离的工序;以及(3)对工序(2)中分离出的磁性粒子上的免疫复合体进行测定的工序。通过本发明,可以提供高灵敏度、测定范围广的试样中的 FGF-23 的测定方法。



CN 103180733 B

1. 一种试样中的成纤维细胞生长因子-23的测定方法,以下将该成纤维细胞生长因子-23记为 FGF-23,该测定方法的特征在于,包含以下的工序:

(1) 使试样中的 FGF-23 在水性介质中和未结合有与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段的磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应,从而在磁性粒子上产生由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体的工序,其中所述抗体的片段为 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fab' ;

(2) 利用磁力聚集工序(1)后的反应混合物中的磁性粒子,从而将通过磁力聚集的磁性粒子与除其以外的成分分离的工序;以及

(3) 对工序(2)中分离出的磁性粒子上的免疫复合体进行测定的工序。

2. 根据权利要求 1 所述的测定方法,其中,第 2 抗体为经标记化的抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的测定方法,其中,经标记化的抗体为碱性磷酸酶标记抗体。

4. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的测定方法,其中,工序(3)的磁性粒子上的免疫复合体的测定通过化学发光的测定来进行。

5. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的测定方法,其中,试样为血清或血浆。

6. 根据权利要求 4 所述的测定方法,其中,试样为血清或血浆。

7. 试样中的 FGF-23 测定试剂在权利要求 1 所述的试样中的 FGF-23 的测定方法中的用途,所述试样中的 FGF-23 测定试剂含有未结合有与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段的磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段,其中,所述抗体的片段为 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fab' 。

8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中,第 2 抗体为经标记化的抗体。

9. 根据权利要求 8 所述的用途,其中,经标记化的抗体为碱性磷酸酶标记抗体。

10. 根据权利要求 7~9 中任一项所述的用途,其中,所述测定试剂进一步含有化学发光测定试剂。

11. 根据权利要求 7~9 中任一项所述的用途,其中,试样为血清或血浆。

12. 根据权利要求 10 所述的用途,其中,试样为血清或血浆。

## 成纤维细胞生长因子 -23 的测定方法及测定试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及试样中的成纤维细胞生长因子 -23 (以下记为 FGF-23) 的测定方法及 FGF-23 的测定试剂。

### 背景技术

[0002] FGF-23 是成纤维细胞生长因子(FGF) 家族的一员,主要是由在骨组织中产生的 251 个氨基酸构成的多肽,其作用于肾脏,阻碍肾小管处的磷的再吸收。近年来指出,在低磷血症性佝偻病、肿瘤性骨软化病症、肾功能衰竭等疾病中的 FGF-23 的相关性(参照非专利文献 1)。

[0003] FGF-23 形成为 N 末端的 24 个氨基酸脱离后的 227 个氨基酸所构成的多肽受到修饰并添加有糖链的结构,以约 32.5kDa 的成熟的蛋白释放到细胞外。另外,FGF-23 在凝血酶的作用下距离 N 末端的第 197 位和第 198 位之间的键被剪切,第 198-251 位的片段作为 C 末端片段存在于血中。

[0004] 在此之前已经报道了获得了针对 FGF-23 的抗体(参照专利文献 1 及 2、非专利文献 2)、和使用了该抗体的血清或血浆中的 FGF-23 的免疫测定方法(参照专利文献 1、非专利文献 2),基于该测定方法的测定试剂盒也在市场上有售 [Human Intact FGF-23ELISA Kit (Immutopics 公司)、Human FGF-23 (C-Term)ELISA Kit (Immutopics 公司)、FGF-23 测定试剂(Kainos 公司)]。

[0005] 但是,之前的免疫测定方法是利用平板法的测定方法,该方法存在测定灵敏度低、测定范围窄等问题。特别是在慢性肾脏病(CKD)患者及透析患者中存在数 pg/mL ~ 数万 pg/mL 浓度范围的检体,存在着在低浓度检体中由于精度不良而无法获得准确的测定值、在高浓度检体中超过测定范围等课题。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献 1 :W02003/057733 小册子

[0009] 专利文献 2 :日本特表 2004-504063 号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献 1 :腎と骨代謝(肾和骨代谢), vol. 15, No. 4, p. 351 ~ 356 (2002)。

[0012] 非专利文献 2 :N ENGL J MED, vol. 348, No. 17, p. 1656 ~ 1663 (2003)。

### 发明内容

[0013] 发明要解决的技术问题

[0014] 本发明的目的在于提供高灵敏度、测定范围广的试样中的 FGF-23 的测定方法及测定试剂。

[0015] 用于解决技术问题的手段

[0016] 本发明人等为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现 :通过使用磁性粒子作

为载体的免疫测定方法,能够以高灵敏度进行测定范围广的 FGF-23 的测定,从而完成了本发明。即,本发明涉及以下的 [1] ~ [10]。

[0017] [1] 一种试样中的 FGF-23 的测定方法,其特征在于,包含以下工序:

[0018] (1)使试样中的 FGF-23 在水性介质中和磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应,从而在磁性粒子上生成由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体的工序;

[0019] (2)利用磁力聚集工序(1)后的反应混合物中的磁性粒子,从而将通过磁力聚集的磁性粒子与除其以外的成分分离的工序;以及

[0020] (3)对工序(2)中分离出的磁性粒子上的免疫复合体进行测定的工序。

[0021] [2] 上述 [1] 所述的测定方法,其中,第 2 抗体为经标记化的抗体。

[0022] [3] 上述 [2] 所述的测定方法,其中,经标记化的抗体为碱性磷酸酶标记抗体。

[0023] [4] 上述 [1] ~ [3] 中任一项所述的测定方法,其中,工序(3)的磁性粒子上的免疫复合体的测定通过化学发光的测定来进行。

[0024] [5] 上述 [1] ~ [4] 中任一项所述的测定方法,其中,试样为血清或血浆。

[0025] [6] 一种试样中的 FGF-23 测定试剂,其特征在于,含有磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段。

[0026] [7] 上述 [6] 所述的测定试剂,其中,第 2 抗体为经标记化的抗体。

[0027] [8] 上述 [7] 所述的测定试剂,其中,经标记化的抗体为碱性磷酸酶标记抗体。

[0028] [9] 上述 [6] ~ [8] 中任一项所述的测定试剂,其中,进一步含有化学发光测定试剂。

[0029] [10] 上述 [6] ~ [9] 中任一项所述的测定试剂,其中,试样为血清或血浆。

[0030] 发明效果

[0031] 通过本发明,可以提供高灵敏度、测定范围广的试样中的 FGF-23 的测定方法及测定试剂。

## 附图说明

[0032] 图 1 为表示实施例 1 的 FGF-23 测定方法的最小测定浓度的曲线图,是表示试样中的 FGF-23 浓度与发光量之间的关系的曲线图。横轴表示 FGF-23 浓度(pg/mL),纵轴表示发光量(RLU)。I 表示平均值  $\pm 2SD$  的范围。另外,虚线表示空白 +2SD 的发光量。

[0033] 图 2 为表示实施例 2 的 FGF-23 测定方法的测定范围的曲线图,是表示试样中的 FGF-23 浓度与发光量之间的关系的曲线图。横轴表示 FGF-23 浓度(pg/mL),纵轴表示发光量(RLU)。

[0034] 图 3 为表示使用了透析患者来源的血清(患者血清 D)的实施例 3 的测定方法的稀释线性的曲线图,是表示稀释率与 FGF-23 浓度之间的关系的曲线图。横轴表示该血清的稀释率,纵轴表示所确定的 FGF-23 浓度(pg/mL)。

[0035] 图 4 为表示使用了透析患者来源的血清(患者血清 E)的实施例 3 的测定方法的稀释线性的曲线图,是表示稀释率与 FGF-23 浓度之间的关系的曲线图。横轴表示该血清的稀释率,纵轴表示所确定的 FGF-23 浓度(pg/mL)。

[0036] 图 5 为表示使用平板的比较例 1 的 FGF-23 测定方法的最小测定浓度的曲线图,是表示试样中的 FGF-23 浓度与吸光度之间的关系的关系的曲线图。横轴表示 FGF-23 浓度 (pg/mL),纵轴表示吸光度 (Abs)。I 表示平均值的范围。另外,虚线表示空白 +2SD 的吸光度。

[0037] 图 6 为表示使用平板的比较例 2 的 FGF-23 测定方法的测定范围的曲线图,是表示试样中的 FGF-23 浓度与吸光度之间的关系的关系的曲线图。横轴表示 FGF-23 浓度 (pg/mL),纵轴表示吸光度 (Abs)。

[0038] (测定方法)

[0039] 本发明的试样中的 FGF-23 的测定方法是使用磁性粒子作为载体的利用夹心法的试样中的 FGF-23 的免疫测定方法,该测定方法包含以下工序。

[0040] (1)使试样中的 FGF-23 在水性介质中和磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应,从而在磁性粒子上生成由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体的工序;

[0041] (2)利用磁力聚集工序(1)后的反应混合物中的磁性粒子,从而将通过磁力聚集的磁性粒子与除其以外的成分分离的工序;以及

[0042] (3)对工序(2)中分离出的磁性粒子上的免疫复合体进行测定的工序。

[0043] <工序(1)>

[0044] 工序(1)中,试样中的 FGF-23 在水性介质中和磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应,从而在磁性粒子上生成由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体。

[0045] 这里,试样中的 FGF-23 和磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段的反应只要是在磁性粒子上生成由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体,则任何反应都可以,例如可以使试样中的 FGF-23 和磁性粒子及与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段反应,在磁性粒子上生成与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段和 FGF-23 的免疫复合体,然后使与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应;也可以使试样中的 FGF-23 和磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段同时反应。当在磁性粒子上生成与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段及 FGF-23 的免疫复合体后再使与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段反应时,在生成该免疫复合体后还可设置洗涤工序。

[0046] 工序(1)中,与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段和磁性粒子还可在和试样中的 FGF-23 发生反应之前预先使它们结合。与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段对磁性粒子的结合可举出利用物理吸附的结合、借助连接物的结合、利用抗体的 Fc 区域 - 结合于 Fc 区域的抗体、抗生物素蛋白类(抗生物素蛋白、链霉亲和素、亲和素等) - 生物素等 2 个亲和性物质间的相互作用的结合等。利用抗体的 Fc 区域与结合于 Fc 区域的抗体的相互作用时,例如可通过固定在磁性粒子上的与 Fc 区域结合的抗体和第 1 抗体或其片段的相互作用而使第 1 抗体或其片段结合在磁性粒子上。当利用抗生物素蛋白类与生物素的相互作用时,例如可以通过固定在磁性粒子上的抗生物素蛋白类与生物素结合第 1 抗体或其片段中的生物素的相互作用而使第 1 抗体或其片段结合在磁性粒子上。

[0047] 反应溶液中的磁性粒子的浓度只要是能够测定本发明的 FGF-23 的浓度则无特别限定,通常为 0.1 ~ 10mg/mL。反应温度只要是能够测定本发明的 FGF-23 的温度则无特别限定,通常为 0 ~ 50℃,优选为 4 ~ 45℃,特别优选为 20 ~ 40℃。反应时间只要是能够测定本发明的 FGF-23 的时间则无特别限定,通常为 5 分钟 ~ 1 小时,优选为 5 ~ 20 分钟。

[0048] 当使用预先结合有与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段的磁性粒子时,结合有与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段的磁性粒子只要是使本发明的 FGF-23 的测定方法成为可能,则可通过任何方法来制造。例如,在 0.1 ~ 10mg/mL 的磁性粒子的混悬液中添加 0.1 ~ 10 μg/mL 的第 1 抗体或其片段溶液,在 37℃ 下使其反应 5 分钟 ~ 1 小时,由此可以制造结合有第 1 抗体或其片段的磁性粒子。

[0049] 另外,工序(1)中,在生成由试样中的 FGF-23 和与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段及磁性粒子构成的免疫复合体后使与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段结合在该免疫复合体上时,可以在使该第 2 抗体结合之前设置结合有免疫复合体的磁性粒子的洗涤工序。磁性粒子的洗涤只要是能够在磁性粒子上生成由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体,则可以是任何洗涤,例如可举出从在磁性粒子上生成 FGF-23 和与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段的免疫复合体的反应后的反应混合物中除去磁性粒子以外的成分、在残留有磁性粒子的反应容器中添加洗涤液来对磁性粒子进行洗涤的方法;在向反应后的反应混合物中添加洗涤液的同时将磁性粒子以外的成分除去来对磁性粒子进行洗涤的方法等。磁性粒子以外的成分的除去例如可通过利用磁力将磁性粒子聚集并将残留成分抽吸来进行。作为洗涤液,只要是使本发明的 FGF-23 的测定成为可能的洗涤液则无特别限定,例如可举出后述的水性介质、在后述的水性介质中添加有表面活性剂的水性介质等。作为表面活性剂,例如可举出吐温(Tween)20 等非离子性表面活性剂等。

[0050] 此外,在工序(1)中还可使盐类共存。作为盐类,只要是使本发明的 FGF-23 的测定方法成为可能的盐类则无特别限定,例如可举出氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁、氯化铵、溴化锂、溴化钠、溴化钾、溴化钙、溴化镁、溴化铵等,优选氯化钠。盐类在反应中的浓度只要是使本发明的测定方法成为可能的浓度则无特别限定,例如为 40 ~ 400mmol/L,优选为 70 ~ 250mmol/L。

[0051] 另外,在工序(1)中,可以使金属离子、糖类、防腐剂、蛋白质、表面活性剂、蛋白质稳定剂等共存。作为金属离子,例如可举出镁离子、锰离子、锌离子等。作为糖类,例如可举出甘露醇、山梨糖醇等。作为防腐剂,例如可举出叠氮化钠、抗生素(链霉素、青霉素、庆大霉素等)、BioAce、ProClin300 等。作为蛋白质,例如可举出牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)、酪蛋白、BlockAce(大日本制药公司制)等。作为表面活性剂,例如可举出阳离子性表面活性剂、阴离子性表面活性剂、两性表面活性剂、非离子性表面活性剂等。作为蛋白质稳定化剂,例如可举出过氧化物酶稳定化缓冲液、碱性磷酸酶稳定化缓冲液等。

[0052] <工序(2)>

[0053] 工序(2)中,通过磁力将工序(1)后的磁性粒子、即结合有由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体的磁性粒子聚集,将通过磁力聚集的磁性粒子与除其之外的成分分离。用于聚集磁性粒子的磁力只要是使得本发明的 FGF-23 的测定成为可能的磁力则无特别限定。通过磁力聚集的磁性粒

子与除其之外的成分的分离只要是使得本发明的 FGF-23 的测定成为可能的分离则无特别限定。

[0054] 另外,还可包含在工序(2)之后或者在与工序(2)的同时将结合有由与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、FGF-23 及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体的磁性粒子进行洗涤的工序。磁性粒子的洗涤例如可通过前述的方法等来进行。

[0055] <工序(3)>

[0056] 接着,在工序(3)中,通过测定通过工序(2)分离出的磁性粒子上的免疫复合体,可以测定试样中的 FGF-23。作为免疫复合体的测定方法,例如可举出以下的方法等。

[0057] (1) 与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段未被标记化的情况

[0058] 使在与第 2 抗体或其片段结合的第 3 抗体或其片段上结合有标记的标记化第 3 抗体或其片段与由第 1 抗体或其片段、FGF-23 及第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体所结合的磁性粒子发生反应,在磁性粒子上形成由第 1 抗体或其片段、FGF-23、第 2 抗体或其片段及第 3 抗体或其片段构成的免疫复合体,通过测定该免疫复合体中的标记,可以测定分离出的磁性粒子上的免疫复合体。作为与第 2 抗体或其片段结合的第 3 抗体或其片段,例如可举出与第 2 抗体的 Fc 区域结合的抗体或其片段等。标记的测定只要是使分离出的磁性粒子上的免疫复合体的测定成为可能的方法则无特别限定,例如可举出化学发光的测定、荧光的测定、吸光度的测定等,优选化学发光的测定。

[0059] (2) 与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段经过标记化的情况

[0060] 通过对形成在磁性粒子上的由第 1 抗体或其片段、FGF-23 及经标记化的与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体中的标记进行测定,可以测定分离出的磁性粒子上的免疫复合体。标记的测定只要是使分离出的磁性粒子上的免疫复合体的测定成为可能的方法则无特别限定,例如可举出化学发光的测定、荧光的测定、吸光度的测定等,优选化学发光的测定。

[0061] (A) 化学发光的测定

[0062] 化学发光的测定可通过以下的方法等来进行。

[0063] (A-1) 标记为酶的情况

[0064] 当标记为酶时,例如可通过使与该酶发生反应而产生光的底物作用于标记化抗体或片段、利用发光强度计等对所产生的光(hv)的强度进行测定来进行。作为酶,只要是能够与该酶的底物反应而产生光的酶则无特别限定,例如可举出碱性磷酸酶、过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、荧光素酶等。

[0065] 使用碱性磷酸酶作为酶时,作为与碱性磷酸酶发生反应而产生光的碱性磷酸酶的底物,例如可举出 3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷·二钠盐(AMPPD)、2-氯-5-{4-甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷]-4-基}苯基磷酸酯·二钠盐(CDP-Star<sup>TM</sup>)、3-{4-甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷]-4-基}苯基磷酸酯·二钠盐(CSPD<sup>TM</sup>)、[10-甲基-9(10H)-吖啶叉基(acridinylidene)]苯氧基甲基磷酸·二钠盐(Lumigen<sup>TM</sup> APS-5)、9-(4-氯苯基硫代磷酸氧基亚甲基)-10-甲基吖啶酮二钠盐等。

[0066] 使用过氧化物酶作为酶时,作为与过氧化物酶发生反应而产生光的过氧化物酶的底物,例如可举出过氧化氢与发光化合物的组合等。作为发光化合物,例如可举出鲁米诺化

合物、光泽精化合物等。

[0067] 使用  $\beta$ -D-半乳糖苷酶作为酶时,作为与  $\beta$ -D-半乳糖苷酶发生反应而产生光的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶的底物,例如可举出 Galacton-Plus[Applied Biosystems 公司制]等。

[0068] 使用荧光素酶作为酶时,作为与荧光素酶发生反应而产生光的荧光素酶的底物,例如可举出荧光素、腔肠素等。

[0069] (A-2) 标记为发光物质的情况

[0070] 当标记为发光物质时,例如可通过利用发光强度计等测定所产生的来自于免疫复合物中的发光物质的光的强度来进行。作为发光物质,只要是使本发明的测定成为可能的发光物质则无特别限定,例如可举出吖啶鎓及其衍生物、钆络合物化合物、洛芬碱等。

[0071] (B) 荧光的测定

[0072] 荧光的测定可通过以下的方法等来进行。

[0073] (B-1) 标记为酶的情况

[0074] 当标记为酶时,例如可通过使与该酶发生反应而产生荧光的底物作用于标记化抗体或片段、利用荧光强度计测定所产生的荧光的强度来进行。作为酶,只要是能够与该酶的底物发生反应而产生荧光的酶则无特别限定,例如可举出过氧化物酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶等。

[0075] 使用过氧化物酶作为酶时,作为与过氧化物酶发生反应而生成荧光的过氧化物酶的底物,例如可举出过氧化氢与荧光化合物的组合等。作为荧光化合物,例如可举出 4-羟基苯基醋酸、3-(4-羟基苯基)丙酸、香豆素等。

[0076] 使用  $\beta$ -D-半乳糖苷酶作为酶时,作为与  $\beta$ -D-半乳糖苷酶发生反应而产生荧光的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶的底物,例如可举出 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷或其类似化合物等。

[0077] 使用  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶作为酶时,作为与  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶发生反应而产生荧光的  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶的底物,例如可举出 TokyoGreen<sup>TM</sup>- $\beta$  GluU (积水 Medical 公司制)等。

[0078] (B-2) 标记为荧光物质的情况

[0079] 当标记为荧光物质时,例如可通过利用荧光强度计等测定所产生的来自于免疫复合物中的荧光物质的荧光的强度来进行。作为荧光物质,只要是使本发明的测定成为可能的荧光物质则无特别限定,例如可举出 FITC (异硫氰酸荧光素)、RITC (罗丹明 B 异硫氰酸酯)、quantum dot (Science, 281, 2016-2018, 1998)、藻红蛋白等藻胆蛋白、GFP (绿色荧光蛋白, Green fluorescent Protein)、RFP (红色荧光蛋白, Red fluorescent Protein)、YFP (黄色荧光蛋白, Yellow fluorescent Protein)、BFP (蓝色荧光蛋白 Blue fluorescent Protein) 等。

[0080] (C) 吸光度的测定

[0081] 吸光度的测定可通过以下的方法等来进行。

[0082] (C-1) 标记为酶的情况

[0083] 当标记为酶时,例如可通过使与该酶发生反应而产生色素的底物作用于标记化抗体或片段、利用分光光度计或酶标仪等测定所产生的色素的吸光度来进行。作为酶,只要是能够与该酶的底物发生反应而产生色素的酶则无特别限定,例如可举出过氧化物酶等。

[0084] 当使用过氧化物酶作为酶时,作为与过氧化物酶发生反应而产生色素的过氧化

物酶的底物,例如可举出过氧化氢与氧化显色型色原体的组合等。作为氧化显色型色原体,例如可举出无色型色原体、氧化偶联发色型色原体等。

[0085] 无色型色原体是在过氧化氢和过氧化物酶等过氧化活性物质的存在下单独地转变成色素的物质。具体地可举出四甲基联苯胺、邻苯二胺、10-N-羧甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪(CCAP)、10-N-甲基氨基甲酰基-3,7-双(二甲基氨基)-10H-吩噻嗪(MCDP)、N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-双(二甲基氨基)二苯基胺钠盐(DA-64)、4,4'-双(二甲基氨基)二苯基胺、双(3-双(4-氯苯基)甲基-4-二甲基氨基苯基)胺(BCMA)等。

[0086] 氧化偶联发色型色原体是在过氧化氢和过氧化物酶等过氧化活性物质的存在下2个化合物发生氧化偶联而产生色素的物质。作为2个化合物的组合,可举出偶联剂与苯胺类(Trinder试剂)的组合、偶联剂与苯酚类的组合等。作为偶联剂,例如可举出4-氨基安替比林(4-AA)、3-甲基-2-苯并噻唑啉酮肼等。作为苯胺类,可举出N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺(MAOS)、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(DAOS)、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲基苯胺(TOPS)、N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺(HDAOS)、N,N-二甲基-3-甲基苯胺、N,N-双(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-(3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、N-乙基-N-(3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲氧基苯胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)苯胺、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-琥珀酰基乙二胺(EMSE)、N-乙基-N-(3-甲基苯基)-N'-乙酰基乙二胺、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-4-氟-3,5-二甲氧基苯胺(F-DAOS)等。作为苯酚类,可举出苯酚、4-氯苯酚、3-甲基苯酚、3-羟基-2,4,6-三碘苯甲酸(HTIB)等。

[0087] 根据磁性粒子上生成的免疫复合体测定中的测定值来确定试样中的FGF-23浓度例如可通过以下的方法来进行。

[0088] 使用已知浓度的FGF-23进行上述工序(1)~工序(3),制作表示FGF-23的浓度与测定值(标记来源的信息量)的关系的标准曲线,接着使用待测定的试样进行测定,将所得测定值对照预先制作的标准曲线,从而确定待测定试样中的FGF-23浓度。

[0089] (试样)

[0090] 作为本发明中的试样,只要是使本发明的FGF-23的测定成为可能的试样则无特别限定,例如可举出全血、血浆、血清、髓液、唾液、羊水、尿、汗、胰液等,优选血浆、血清等。

[0091] (水性介质)

[0092] 作为本发明中使用的水性介质,只要是使本发明的FGF-23的测定成为可能的水性介质则无特别限定,例如可举出去离子水、蒸馏水、缓冲液等,优选缓冲液。作为缓冲液的制备中使用的缓冲剂,只要是具有缓冲能力则无特别限定,可举出pH为1~11的例如乳酸缓冲剂、柠檬酸缓冲剂、醋酸缓冲剂、琥珀酸缓冲剂、邻苯二甲酸缓冲剂、磷酸缓冲剂、三乙醇胺缓冲剂、二乙醇胺缓冲剂、赖氨酸缓冲剂、巴比妥酸缓冲剂、咪唑缓冲剂、苹果酸缓冲剂、草酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、硼酸缓冲剂、碳酸缓冲剂、甘氨酸缓冲剂、Good's缓冲剂等。

[0093] 作为Good's缓冲剂,例如可举出2-吗啉代乙磺酸(MES)缓冲剂、双(2-羟基乙

基) 亚氨基三(羟基甲基) 甲烷(Bis-Tris) 缓冲剂、三(羟基甲基) 氨基甲烷(Tris) 缓冲剂、N-(2-乙酰胺) 亚氨基二醋酸(ADA) 缓冲剂、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES) 缓冲剂、2-[N-(2-乙酰胺) 氨基] 乙磺酸(ACES) 缓冲剂、3-吗啉代-2-羟基丙磺酸(MOPSO) 缓冲剂、2-[N,N-双(2-羟基乙基) 氨基] 乙磺酸(BES) 缓冲剂、3-吗啉代丙磺酸(MOPS) 缓冲剂、2-{N-[三(羟基甲基) 甲基] 氨基} 乙磺酸(TES) 缓冲剂、N-(2-羟基乙基)-N'-(2-磺乙基) 哌嗪(HEPES) 缓冲剂、3-[N,N-双(2-羟基乙基) 氨基]-2-羟基丙磺酸(DIPSO) 缓冲剂、2-羟基-3-{[N-三(羟基甲基) 甲基] 氨基} 丙磺酸(TAPSO) 缓冲剂、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙烷-3-磺酸)(POPSO) 缓冲剂、N-(2-羟基乙基)-N'-(2-羟基-3-磺丙基) 哌嗪(HEPPSO) 缓冲剂、N-(2-羟基乙基)-N'-(3-磺丙基) 哌嗪(EPPS) 缓冲剂、[N-三(羟基甲基) 甲基甘氨酸](Tricine) 缓冲剂、[N,N-双(2-羟基乙基) 甘氨酸](Bicine) 缓冲剂、3-[N-三(羟基甲基) 甲基] 氨基丙磺酸(TAPS) 缓冲剂、2-(N-环己基氨基) 乙磺酸(CHES) 缓冲剂、3-(N-环己基氨基)-2-羟基丙磺酸(CAPSO) 缓冲剂、3-(N-环己基氨基) 丙磺酸(CAPS) 缓冲剂等。

#### [0094] (磁性粒子)

[0095] 作为本发明中的磁性粒子,只要是使本发明的 FGF-23 的测定成为可能的磁性粒子则无特别限定,例如可举出用铁氧体被覆的胶乳、用铁氧体被覆的聚合物粒子等。另外,为了使抗体的结合变得容易,还可使用具有与生物素结合的性质的抗生物素蛋白、在表面固定有亲和素或链霉亲和素的磁性粒子。磁性粒子的粒径并无特别限定,例如为  $1\mu\text{m} \sim 6\mu\text{m}$ , 优选为  $1\mu\text{m} \sim 3\mu\text{m}$ 。作为本发明中的磁性粒子,可以使用市售的磁性粒子。作为市售的磁性粒子,例如可举出 Dynabeads M-280Streptavidin (Dynal 公司制)、Dynabeads M-280Tosylactivated (Dynal 公司制)、Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Dynal 公司制)、Dynabeads MyOne Tosylactivated(Dynal 公司制)、Estepor(Merck 公司制)、Sera-Mag Magnetic Streptavidin Particles (Thermo Scientific 公司制)、MAGNOTEX-SA (JSR 公司制) 等。

#### [0096] (抗体)

[0097] 本发明中与 FGF-23 结合的抗体(第 1 抗体及第 2 抗体)只要是使本发明的 FGF-23 的测定成为可能的抗体则无特别限定,可以使用多克隆抗体、单克隆抗体中的任一种,优选单克隆抗体。另外,本发明中不仅可使用全长的抗体,还可使用抗体片段。作为抗体片段,例如可举出通过对抗体进行木瓜蛋白酶处理而获得的 Fab、通过对抗体进行胃蛋白酶处理而获得的  $F(ab')_2$ 、通过对抗体进行胃蛋白酶处理-还原处理而获得的 Fab' 等除去了 Fc 部分的抗体片段等。当使用其表面固定有抗生物素蛋白、亲和素或链霉亲和素的磁性粒子作为磁性粒子时,可以使用生物素结合于第 1 抗体而成的生物素结合第 1 抗体。

[0098] 本发明中使用的与 FGF-23 结合的第 1 抗体和第 2 抗体中,各个抗体所结合的 FGF-23 的部位可以相同也可不同,优选不同。

[0099] 本发明中使用的抗体可使用 FGF-23 本身或相当于 FGF-23 中的表位的肽作为抗原、利用通常的抗体制作方法来获得,还可以市售品的形式获得。作为与 FGF-23 结合的抗体,例如可举出以 FERM BP-7838、FERM BP-7839、FERM BP-7840、FERM BP-8268 分别保藏的杂交瘤所产生的单克隆抗体等。

[0100] 另外,在本发明的 FGF-23 的测定方法及测定试剂中,还可使用与 FGF-23 结合的适

体等抗体以外的物质来代替与 FGF-23 结合的抗体。

[0101] (测定试剂)

[0102] 本发明的试样中的 FGF-23 测定试剂可以用于本发明的试样中的 FGF-23 的测定方法。本发明的测定试剂含有磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段。与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段还可使用结合于磁性粒子者。

[0103] 与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段结合于磁性粒子上时,本发明的测定试剂含有结合有与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段的磁性粒子以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段。

[0104] 与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段未结合于磁性粒子时,本发明的测定试剂含有固定有 2 个亲和性物质中一者的磁性粒子、结合有 2 个亲和性物质中另一者的第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段。作为 2 个亲和性物质的组合,例如可举出抗生物素蛋白、链霉亲和素、亲和素等抗生物素蛋白类与生物素的组合等。作为本发明的测定试剂的一个方式,例如可举出含有固定有抗生物素蛋白类的磁性粒子、生物素结合于与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段而成的生物素结合第 1 抗体或其片段、以及与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段的测定试剂。

[0105] 第 2 抗体或其片段被标记化时,本发明的测定试剂进一步含有能够对由第 1 抗体或其片段、FGF-23 及标记化第 2 抗体或其片段构成的免疫复合体中的标记化第 2 抗体或其片段进行测定的标记测定试剂。标记测定试剂只要是能够对所产生的该免疫复合体中的标记化第 2 抗体或其片段进行测定的试剂则无特别限定,例如可举出化学发光测定试剂、荧光测定试剂等,优选化学发光测定试剂。

[0106] 与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段未经标记化时,本发明的测定试剂进一步含有在与该第 2 抗体或其片段结合的第 3 抗体或其片段上结合有标记的标记化第 3 抗体或其片段、以及能够对由第 1 抗体或其片段、FGF-23、第 2 抗体或其片段及标记化第 3 抗体或其片段构成的免疫复合体中的标记化第 3 抗体或其片段进行测定的标记测定试剂。作为与第 2 抗体或其片段结合的第 3 抗体或其片段,例如可举出与第 2 抗体的 Fc 区域结合的抗体或其片段等。另外,能够对该免疫复合体中的标记化第 3 抗体或其片段进行测定的标记测定试剂只要是能够测定所产生的该免疫复合体中的标记化第 3 抗体或其片段的试剂则无特别限定,例如可举出化学发光测定试剂、荧光测定试剂、吸光度测定试剂等,优选化学发光测定试剂。

[0107] 化学发光测定试剂特别地是标记为酶时所使用的试剂,可举出含有与该酶发生反应而产生光的酶的底物的试剂等。对于酶和与该酶发生反应而产生光的酶的底物的组合,可举出前述的组合等。

[0108] 荧光测定试剂特别地是标记为酶时所使用的试剂,可举出含有与该酶发生反应而产生荧光的酶的底物的试剂等。对于酶和与该酶发生反应而产生荧光的酶的底物的组合,可举出前述的组合等。

[0109] 吸光度测定试剂特别地是标记为酶时所使用的试剂,可举出含有与该酶发生反应而产生色素的酶的底物的试剂等。对于酶和与该酶发生反应而产生色素的酶的底物的组合,可举出前述的组合等。

[0110] 作为本发明的测定试剂中使用的磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段,例如可分别举出前述的磁性粒子、与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段等。另外,本发明的测定试剂中还可根据需要分别含有前述的水性介质、标记酶的底物、金属离子、糖类、防腐剂、蛋白质、表面活性剂、蛋白质稳定剂等。

[0111] 以下,通过实施例详细地说明本发明,但这些并不限定本发明的范围。

[0112] 实施例 1

[0113] (1) 材料及测定方法

[0114] <测定用试样>

[0115] 将由健康人获得的血清(FGF-23 浓度为 10pg/mL 的血清;由 Aries 公司购入)用含有 0.2%BSA(Bovogen Biologicals 公司制)的磷酸缓冲化生理盐水(含有 0.15mol/L 氯化钠的 10mmol/L 磷酸缓冲液,pH 为 7.2)进行稀释,使得 FGF-23 浓度达到 9pg/mL、8pg/mL、7pg/mL、6pg/mL、5pg/mL、4pg/mL、3pg/mL、2pg/mL、1pg/mL,将如此稀释后的溶液及含有 0.2%BSA 的磷酸缓冲化生理盐水(FGF-23 浓度为 0pg/mL)用于测定用试样。

[0116] <磁性粒子混悬液>

[0117] 作为磁性粒子,使用结合有链霉亲和素的市售的磁性粒子(Dynabeads MyOne Streptavidin T1;Dyna1 公司制),制备由以下组成构成的磁性粒子混悬液。

[0118]

MES (pH 为 6.5)	50mmol/L
链霉亲和素结合磁性粒子	0.75mg/mL
BSA	0.1%
氯化钠	0.1mol/L

[0119] <生物素结合抗 FGF-23 抗体和生物素结合抗 FGF-23 抗体溶液>

[0120] 作为第 1 抗体,使用以 FERM BP-7838 保藏的杂交瘤所产生的抗 FGF-23 单克隆抗体 2C3B,将该抗体与 NHS-生物素混合,在 37°C 下反应 1 小时,将反应后的混合物供至 Sephadex G-25 柱(GE Health Science Japan 公司制),将未反应的 NHS-生物素除去,从而制备了生物素结合抗 FGF-23 单克隆抗体。使用所得的生物素结合抗 FGF-23 单克隆抗体,制备由以下组成构成的生物素结合抗 FGF-23 抗体溶液。

[0121]

MES (pH 为 6.5)	50mmol/L
抗 FGF-23 单克隆抗体 2C3B	5µg/mL
BSA	0.1%
氯化钠	0.1mol/L

[0122] <碱性磷酸酶标记抗 FGF-23 抗体片段和碱性磷酸酶标记抗 FGF-23 抗体片段溶液>

[0123] 作为第 2 抗体片段,利用胃蛋白酶将以 FERM BP-7839 保藏的杂交瘤所产生的抗 FGF-23 单克隆抗体 3C1E 消化后,利用使用了 G3000SW 柱(Tosoh 公司制;口径:21.5mm;长

度:60cm)的HPLC系统(日立制作所公司制)分离出F(ab')<sub>2</sub>。利用2-巯基乙胺盐酸盐(Nacalai Tesque公司制)将所得的F(ab')<sub>2</sub>还原后,利用使用了G3000SW柱(Tosoh公司制;口径:21.5mm;长度:60cm)的HPLC系统(日立制作所公司制)分离出Fab'。按照以下顺序,利用马来酰亚胺法使所得的Fab'与碱性磷酸酶结合。

[0124] 使用马来酰亚胺化试剂 Sulfo-HMCS (同仁化学研究所公司制)将碱性磷酸酶马来酰亚胺化,将反应混合物供至 Sephadex G-25 柱(GE Health Science Japan 公司制)将未反应的 Sulfo-HMCS 除去,从而获得马来酰亚胺化碱性磷酸酶。

[0125] 将所制得的马来酰亚胺化碱性磷酸酶与 Fab' 混合,制作了碱性磷酸酶标记 Fab' 抗体。使用所得的碱性磷酸酶标记 Fab' 抗体,制备由以下组成构成的碱性磷酸酶标记抗 FGF-23 抗体片段溶液。

[0126]

MES (pH 为 6.5)	50mmol/L
碱性磷酸酶标记抗 FGF-23 抗体片段	5μg/mL
BSA	0.1%
氯化钠	0.1mol/L

[0127] (2) 试样中的 FGF-23 的测定

[0128] 在上述(1)制得的测定用试样 10 μL 中添加各 30 μL 的(1)所制得的磁性粒子混悬液、生物素结合抗 FGF-23 抗体溶液及碱性磷酸酶标记抗 FGF-23 抗体片段溶液并进行搅拌,在 37°C 下使其反应 20 分钟。利用磁力将磁性粒子聚集,将磁性粒子以外的反应溶液除去,同时利用洗涤液 [含有 0.1% 吐温 20 的 50mmol/L MOPS 缓冲液 (pH 为 7.35)] 将磁性粒子洗涤 5 次。之后,添加以 9-(4-氯苯基硫代磷酸氧基亚甲基)-10-甲基吡啶酮·二钠盐为主成分的发光底物液 100 μL 并进行搅拌,测定所产生的发光量 (RLU)。将测定结果示于图 1。

[0129] 作为规定作为测定体系能够测定的最小浓度的方法,有使用平均值和标准偏差在统计学上进行评价的方法。具体地说,当成为对(1)所制得的试样测定 5 次时的平均值 -2 倍的标准偏差 (-2SD) 比对 0pg/mL 试样测定 5 次时的平均值 + 2 倍的标准偏差 (+2SD) 更高的 RLU 时,则规定为能够检测该试样的浓度。

[0130] 测定 FGF-23 浓度为 0pg/mL 的试样时的发光量的平均 + 2SD 为 173RLU (图 1 的虚线)。而测定 FGF-23 浓度为 1pg/mL 的试样时的发光量的平均 -2SD 为 186RLU, 是比测定 0pg/mL 试样时的发光量的平均 + 2SD 更高的值,因此确认为能够测定 1pg/mL 的 FGF-23。由此,该测定方法中,可以将能够检测 FGF-23 的最小浓度规定为 1pg/mL。另外,如图 1 所示,在 FGF-23 为 1pg/mL 以上的浓度时,可见浓度依赖性的发光量增加。

[0131] 实施例 2

[0132] (1) 材料及测定方法

[0133] <测定用试样>

[0134] 将通过 W02003/057733 所记载的方法制得的 FGF-23 用含有 0.2%BSA (Bovogen Biologicals 公司制)的磷酸缓冲化生理盐水(含有 0.15mol/L 氯化钠的 10mmol/L 磷酸缓冲液, pH 为 7.2)进行稀释,以使得 FGF-23 浓度达到 10000pg/mL、3000pg/mL、1000pg/mL、

300pg/mL、100pg/mL、50pg/mL、10pg/mL、5pg/mL,将如此稀释后的溶液及含有 0.2%BSA 的磷酸缓冲化生理盐水(FGF-23 浓度为 0pg/mL)用于测定用试样。

[0135] (2) 试样中的 FGF-23 的测定

[0136] 除了使用上述(1)的测定用试样之外,通过与实施例 1 相同的方法进行了测定。将其结果示于图 2。

[0137] 由图 2 所示可知,在 5 ~ 10000pg/mL 的浓度范围内,发光量以 FGF-23 浓度依赖性且直线地增加。因此可知,通过本发明的测定方法,可以在 5 ~ 10000pg/mL 的范围内测定 FGF-23 浓度。

[0138] 实施例 3

[0139] 人工透析是指利用外部手段进行血液的陈旧废物除去、电解质维持、水分量维持,但为了防止在体外循环的血液的凝固,要使用抗凝剂(肝素)。因此,在透析患者检体中,在血清分离后多见血纤维蛋白析出。当析出至血清中的血纤维蛋白存在时,有可能对 FGF-23 的测定体系产生影响而无法获得准确的结果。

[0140] 作为判定是否获得了准确的测定值的方法,经常实施同时重现性试验、添加回收试验、稀释线性试验。因此,使用透析患者来源的血清(由 Discovery Life Sciences 公司购入)对实施例 1 的测定方法实施以下的同时重现性试验、添加回收试验、稀释线性试验。

[0141] (1) 同时重现性试验

[0142] 同时重现性试验是指使用同一试样(血清、血浆等)多次、连续地进行测定并对测定值的不均进行评价、从而判断测定方法的准确性的方法。

[0143] 使用透析患者来源的 3 种血清,利用实施例 1 所记载的方法,对各个血清中的 FGF-23 测定 10 次。将由测定获得的 FGF-23 浓度和平均、变异系数(CV%)示于第 1 表。相对于各血清的变异系数为 1.2 ~ 3.1%,是良好的。因此,通过使用本发明的方法,可以重现性良好地测定透析患者来源的血清中的 FGF-23。

[0144] 第 1 表

[0145]

FGF-23浓度 (pg/mL)			
	患者A	患者B	患者C
	<b>370.4</b>	<b>173.7</b>	<b>1904.6</b>
	<b>366.3</b>	<b>165.6</b>	<b>1895.4</b>
	<b>374.0</b>	<b>170.6</b>	<b>1868.0</b>
	<b>367.1</b>	<b>172.0</b>	<b>1906.8</b>
	<b>372.5</b>	<b>173.5</b>	<b>1946.6</b>
	<b>346.9</b>	<b>164.8</b>	<b>1914.0</b>
	<b>361.7</b>	<b>170.9</b>	<b>1914.3</b>
	<b>345.8</b>	<b>166.4</b>	<b>1899.4</b>
	<b>347.4</b>	<b>172.2</b>	<b>1875.8</b>
	<b>351.4</b>	<b>163.8</b>	<b>1915.3</b>
平均	<b>360.4</b>	<b>169.3</b>	<b>1904.0</b>
CV%	<b>3.1</b>	<b>2.2</b>	<b>1.2</b>

[0146] (2) 添加回收试验

[0147] 添加回收试验是指对在试样(血清、血浆等)中添加有已知浓度的抗原(FGF-23)的样品进行测定、通过评价与实际的添加量是否一致来判断测定方法的准确性的方法。

[0148] 在透析患者来源的3种血清中以各种浓度添加通过W02003/057733所记载的方法制得的FGF-23,将它们作为测定用试样使用,利用实施例1所记载的方法进行测定,进行添加回收试验。将添加回收率示于第2表。相对于各血清的添加回收率为96.7~101.6%,是良好的。因此可知,通过使用本发明的测定方法,能够准确地测定透析患者来源的血清中的FGF-23。

[0149] 第2表

[0150]

	血清中FGF-23 pg/mL	添加FGF-23 pg/mL	添加回收率 %
		<b>27.8</b>	<b>98.1</b>
患者血清1	<b>151.2</b>	<b>87.0</b>	<b>97.7</b>
		<b>260.8</b>	<b>96.7</b>
患者血清2	<b>1583.7</b>	<b>877.4</b>	<b>97.3</b>
		<b>2204.4</b>	<b>100.0</b>
		<b>260.8</b>	<b>101.6</b>
患者血清3	<b>2178.2</b>	<b>877.4</b>	<b>98.0</b>
		<b>2204.4</b>	<b>98.3</b>

[0151] (3) 稀释线性试验

[0152] 稀释线性试验是指用适当的稀释液阶梯性地稀释试样(血清、血浆等)、通过评价测定值是否对应着稀释倍率线性地减少来判断测定方法的准确性的方法。

[0153] 将透析患者来源的2种血清(患者血清D、患者血清E)用含有0.2%BSA(Bovogen Biologicals公司制)的磷酸缓冲化生理盐水稀释10个梯度(ten-step),将如此稀释后的溶液及含有0.2%BSA的磷酸缓冲化生理盐水(FGF-23浓度为0pg/mL)用于测定用试样,利用实施例1所记载的方法进行测定,进行稀释线性试验。

[0154] 将对此时的稀释率(x轴)和通过测定所确定的FGF-23浓度(y轴)绘制的图示于图3及图4。由于任一透析患者来源的血清中均获得了良好的线性,因此可知,通过使用本发明的测定方法,可以准确地测定透析患者来源的血清中的FGF-23。

[0155] [比较例1]

[0156] (1) 材料及测定方法

[0157] <测定用试样>

[0158] 将由健康人获得的血清(FGF-23浓度为20pg/mL的血清;由Aries公司购入)用含有0.2%BSA(Bovogen Biologicals公司制)的磷酸缓冲化生理盐水(含有0.15mol/L氯化钠的10mmol/L磷酸缓冲液,pH为7.2)进行稀释,以使得FGF-23浓度达到16pg/mL、14pg/mL、12pg/mL、10pg/mL、8pg/mL、6pg/mL、4pg/mL、2pg/mL,将如此稀释后的溶液及含有0.2%BSA的磷酸缓冲化生理盐水(FGF-23浓度为0pg/mL)用于测定用试样。

[0159] (2) 试样中的FGF-23的测定

[0160] 作为测定试剂盒,使用利用平板法的FGF-23测定试剂(Kainos公司制),作为试样,使用(1)中制得的测定用试样,通过与实施例1相同的方法测定5次。将其结果示于图5。

[0161] 测定FGF-23浓度为0pg/mL的试样时的吸光度的平均+2SD为0.111(图5的虚线)。测定FGF-23浓度为6pg/mL的试样时的吸光度的平均-2SD为0.104,是比测定0pg/mL试样时的吸光度的平均+2SD更低的值,因此确认为无法测定6pg/mL的FGF-23浓度。另一方面,测定FGF-23浓度为8pg/mL的试样时的吸光度的平均-2SD为0.115,是比测定0pg/

mL 试样时的吸光度的平均 + 2SD 更高的值, 因此确认为能够测定 8pg/mL 的 FGF-23。因而, 在该测定方法中, 可以规定能够检测 FGF-23 的最小浓度为 8pg/mL。

[0162] [比较例 2]

[0163] 使用 FGF-23 测定试剂(Kainos 公司制; 平板法), 将测定该试剂中附带的标准溶液 (FGF-23 浓度为 0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、250pg/mL、500pg/mL、800pg/mL) 时的吸光度示于图 6。至 10 ~ 800pg/mL 为止, 吸光度 FGF-23 浓度依赖性地增加。FGF-23 测定试剂的测定范围上限规定为 800pg/mL, 无法对比此更高浓度的 FGF-23 进行定量。

[0164] 另一方面, 本发明的方法中, 如实施例 2 所示, 由于能够测定至 5 ~ 10000pg/mL, 因此可知, 本发明的测定方法相比较于平板法, 是灵敏度更高、测定范围更广的方法。

[0165] 产业上的利用可能性

[0166] 通过本发明, 可以提供对低磷血症性佝偻病、肿瘤性骨软化病症、肾功能衰竭等疾病的诊断有效的高灵敏度、测定范围广的试样中的 FGF-23 的测定方法及测定试剂。

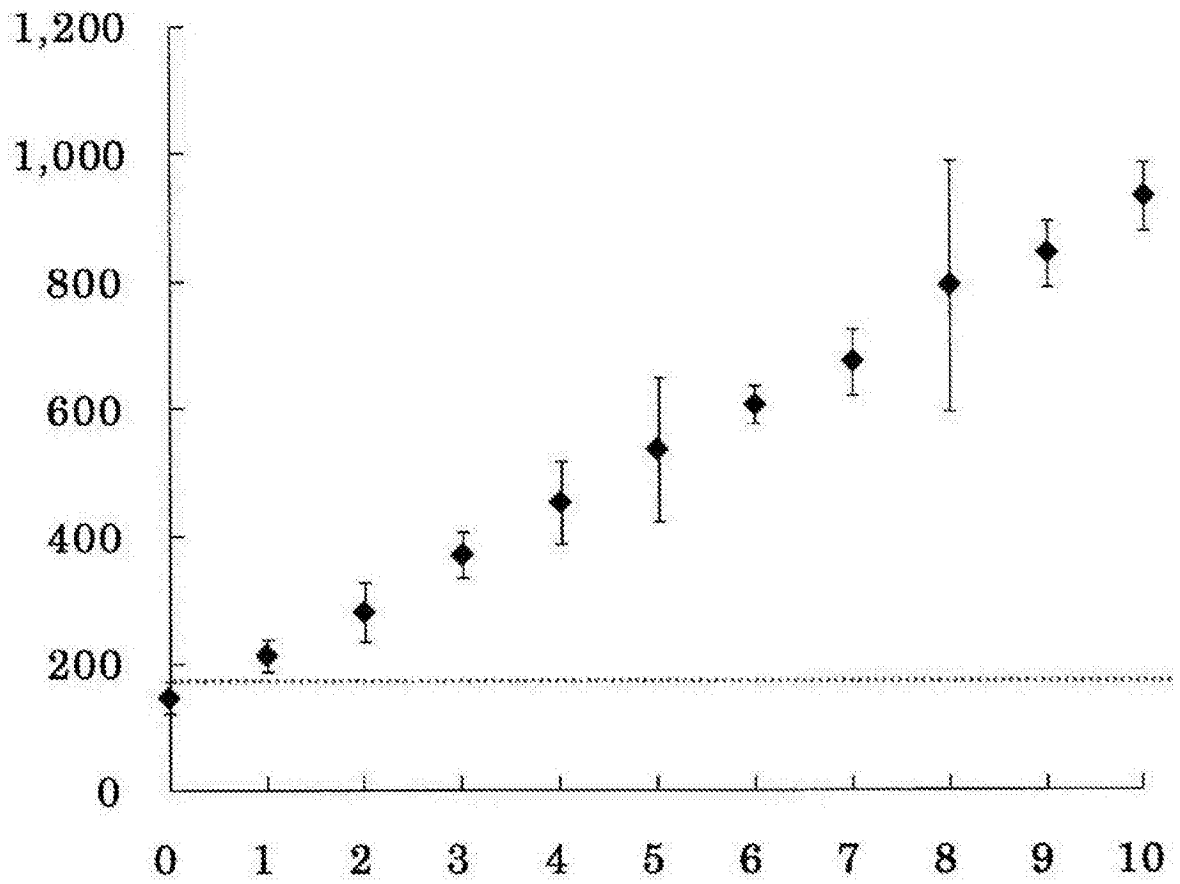


图 1

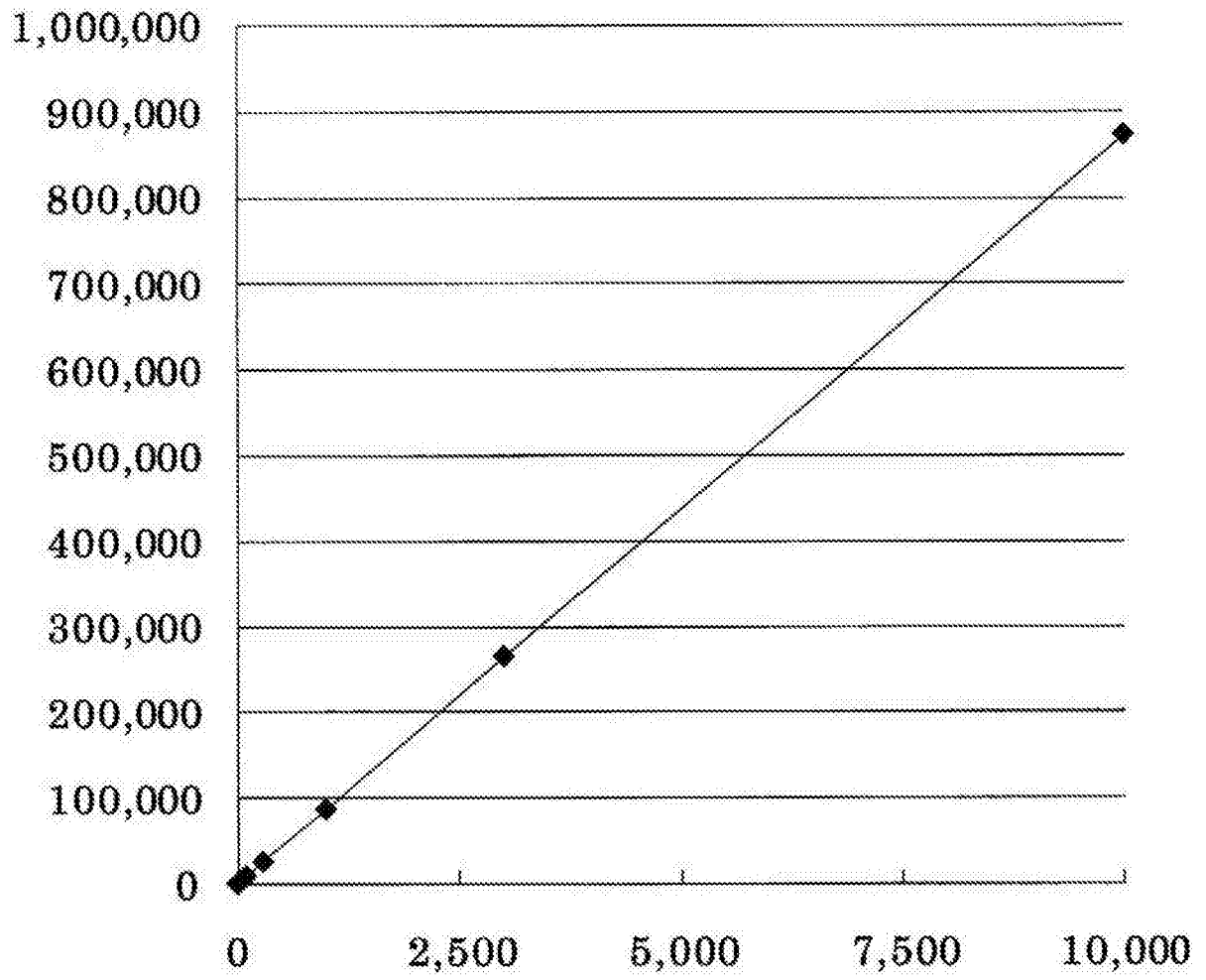


图 2

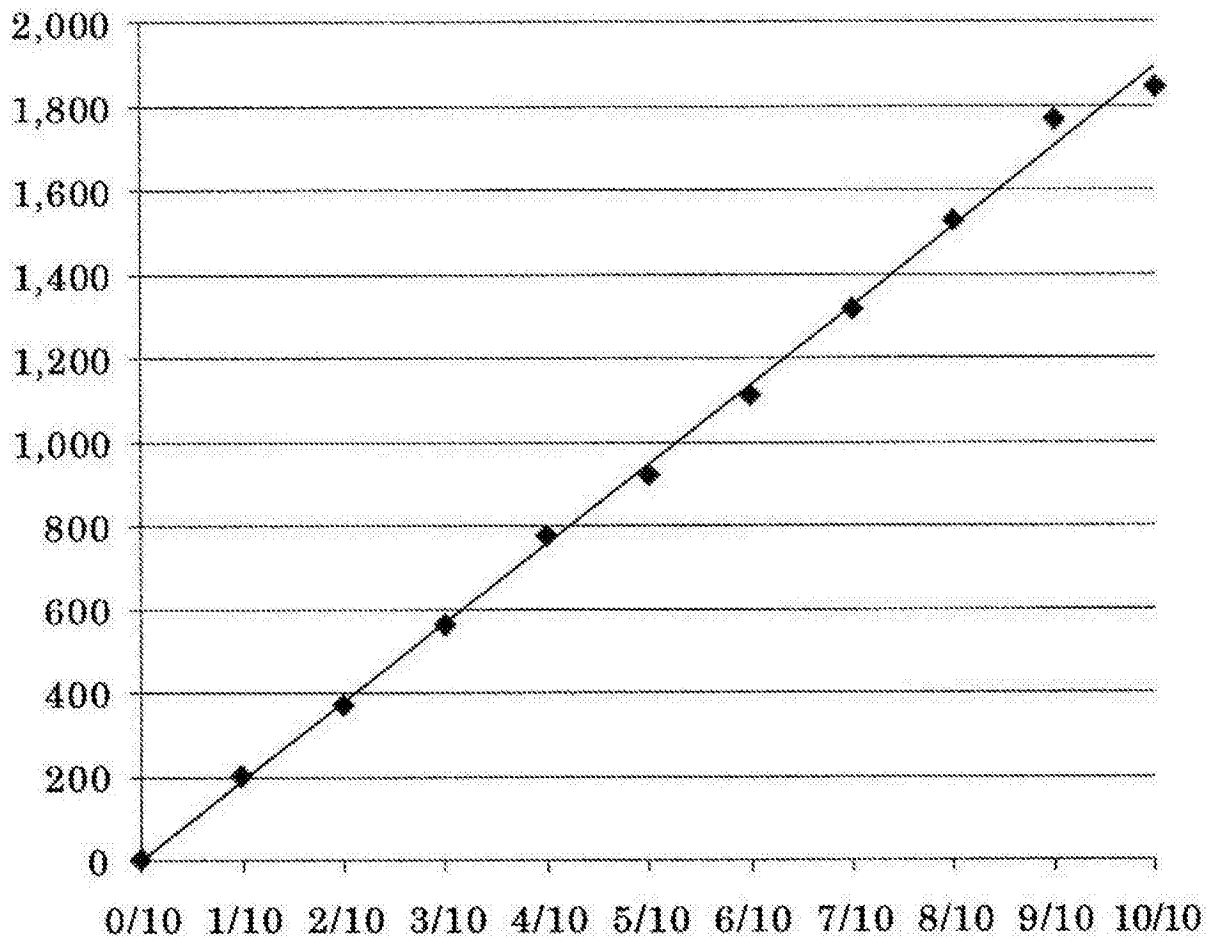


图 3

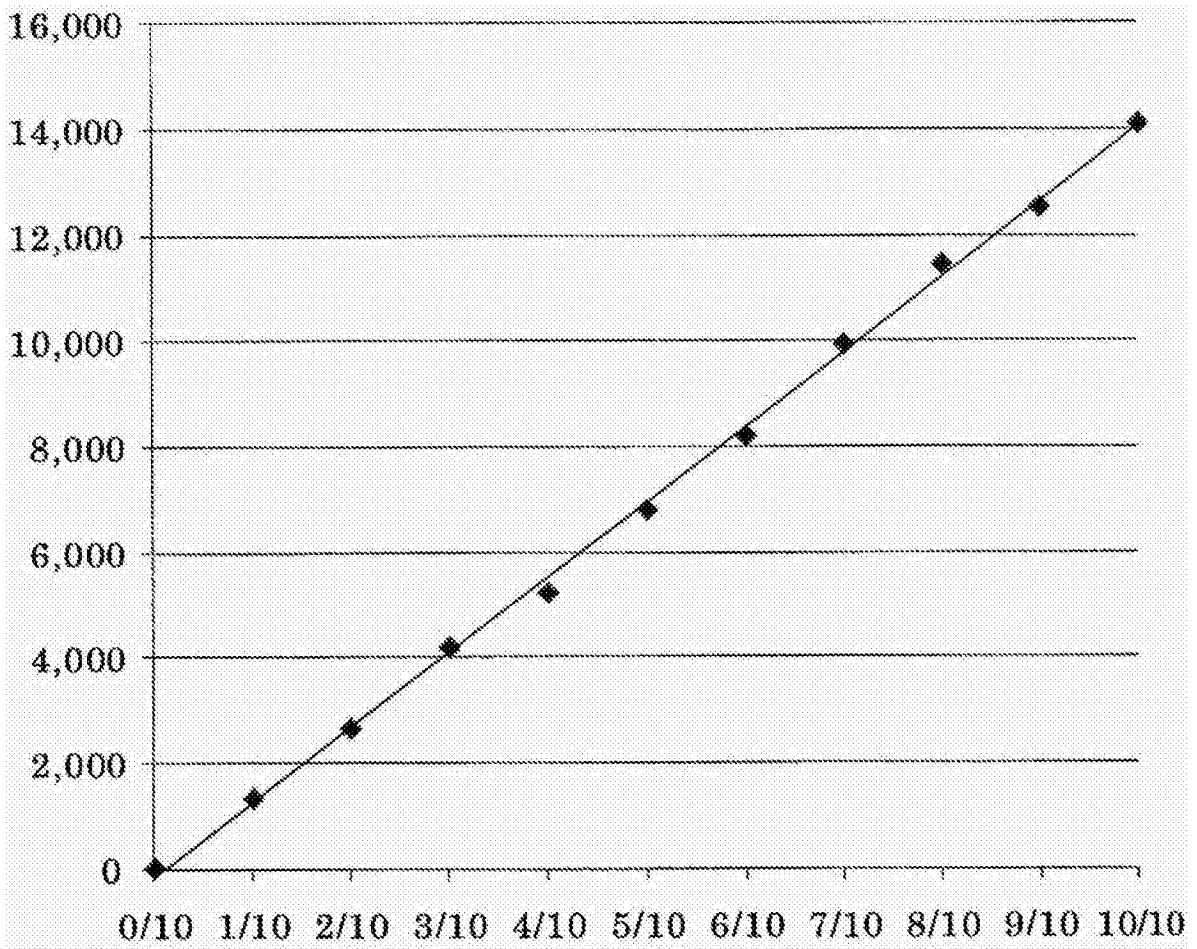


图 4

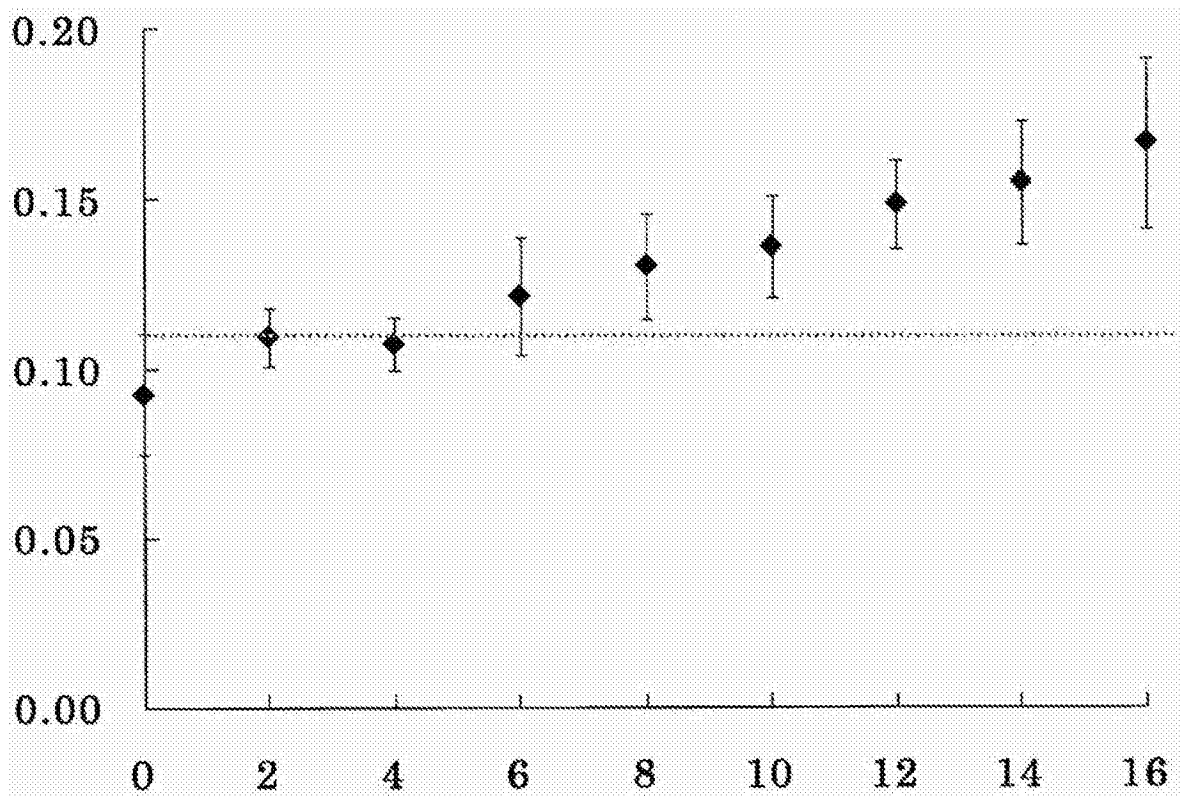


图 5

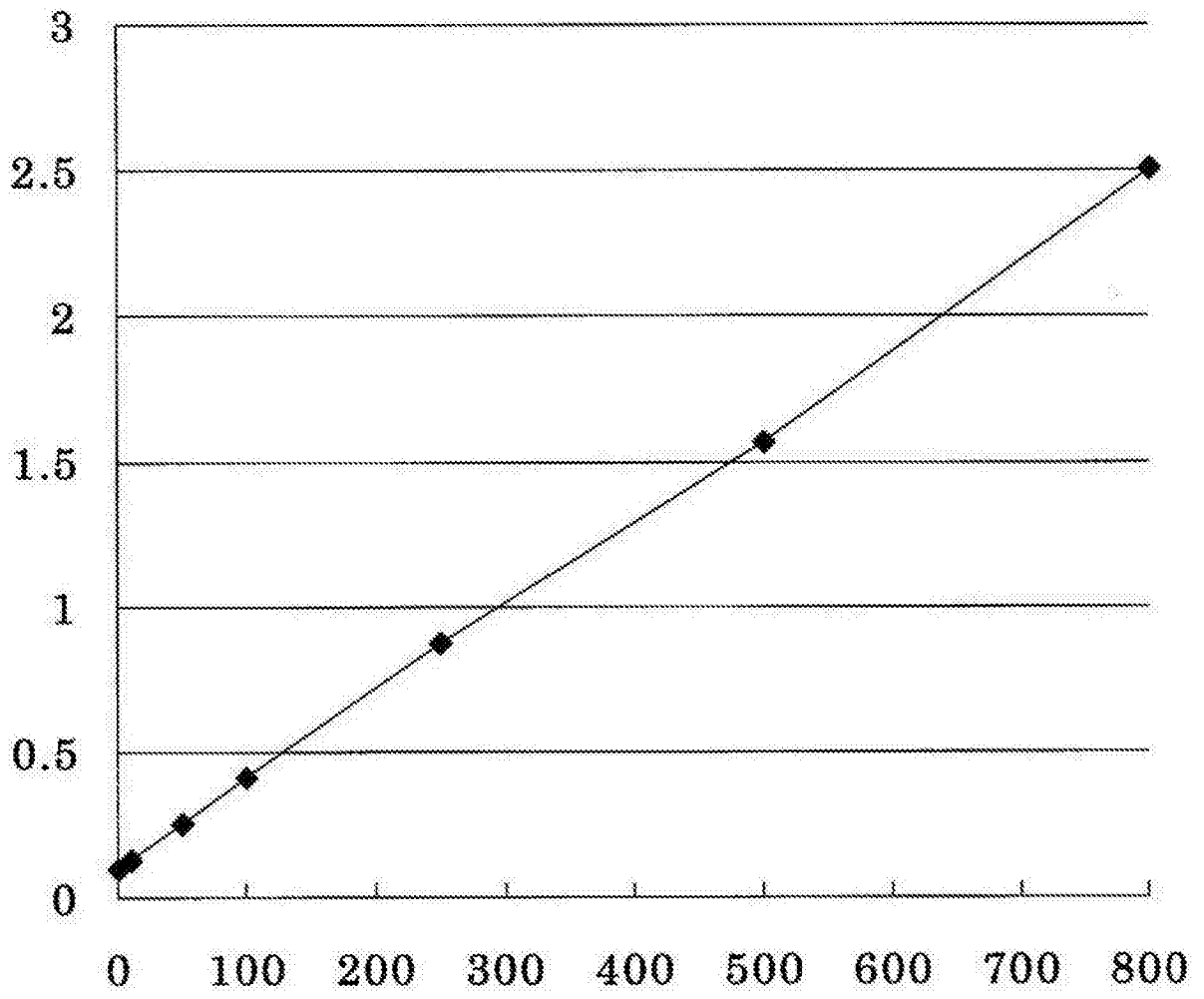


图 6

专利名称(译)	成纤维细胞生长因子-23的测定方法及测定试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN103180733B</a>	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201180051819.5	申请日	2011-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
[标]发明人	鹤泽耕治 铃木惠美子 池田和幸 守田和树		
发明人	鹤泽耕治 铃木惠美子 池田和幸 守田和树		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/54326 G01N2333/50 G01N33/538 G01N33/54333		
代理人(译)	白丽 陈建全		
审查员(译)	周洋		
优先权	2010193213 2010-08-31 JP		
其他公开文献	CN103180733A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供试样中的成纤维细胞生长因子-23 ( FGF-23 ) 的测定方法。该测定方法的特征在于，包含以下工序：( 1 ) 使试样中的FGF-23在水性介质中和磁性粒子、与FGF-23结合的第1抗体或其片段以及FGF-23结合的第2抗体或其片段反应，从而在磁性粒子上产生由与FGF-23结合的第1抗体或其片段、FGF-23及与FGF-23结合的第2抗体或其片段构成的免疫复合体的工序；( 2 ) 利用磁力聚集工序( 1 ) 后的反应混合物中的磁性粒子，从而将通过磁力聚集的磁性粒子与除其之外的成分分离的工序；以及( 3 ) 对工序( 2 ) 中分离出的磁性粒子上的免疫复合体进行测定的工序。通过本发明，可以提供高灵敏度、测定范围广的试样中的FGF-23的测定方法。

