

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03804857.4

C07K 16/18

C12P 21/08

C12N 15/00

A61K 39/395

A61P 19/08

G01N 33/53

C12Q 1/00

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1639193A

[22] 申请日 2003.1.6 [21] 申请号 03804857.4

[30] 优先权

[32] 2001.12.28 [33] JP [31] 401689/2001

[32] 2002.9.6 [33] JP [31] 262020/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/000017 2003.1.6

[87] 国际公布 WO2003/057733 日 2003.7.17

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.30

[71] 申请人 麒麟麦酒株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 山崎雄司 岛田考志 山下武美

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

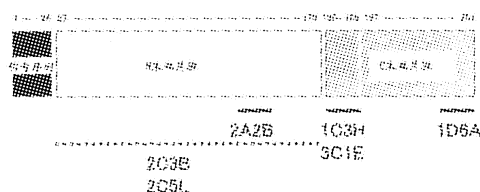
代理人 刘 玥 孟凡宏

权利要求书 3 页 说明书 88 页 序列表 18 页
附图 42 页

[54] 发明名称 抗成纤维细胞生长因子 23 的抗体

[57] 摘要

本发明的目的是提供抗成纤维细胞生长因子 - 23 的抗体。即, 具有控制磷酸盐代谢或维生素 D 代谢的活性的抗体, 和相应于 (a), (b), (c) 中的抗体, 该抗体是通过利用包含一种如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的多肽或包含一种从 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列中通过缺失、替代或添加一个至多个氨基酸而衍生得到的一段氨基酸序列, 并且具有成纤维生长因子 23 活性的多肽免疫动物得到的。(a) 一种识别如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列中的介于第 180 至第 194 位或第 237 至第 251 位之间的氨基酸序列的抗体。(b) 一种由保藏号为 FERM BP - 7838, FERM BP - 7839, FERM BP - 7840, 或 FERM BP - 8268 的杂交瘤所产生的抗体。(c) 一种可与保藏号为 FERM BP - 7838, FERM BP - 7839, FERM BP - 7840, 或 FERM BP - 8268 的杂交瘤所产生的抗体竞争的抗体。



1. 通过利用多肽免疫动物而得到的抗体,所述多肽包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列,或包含从 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列
5 中通过缺失、替代或添加一个或几个氨基酸而衍生得到的氨基酸序列,并且所述抗体具有成纤维细胞生长因子-23 的活性,具有控制磷酸盐代谢或维生素 D 代谢的活性,并且如以下(a)、(b)或(c)所示:

(a) 识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 194 位,或第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的一段氨基酸序列的抗体;

10 (b)由保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的抗体;或

(c) 通过结合由 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列所组成的多肽,与保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的抗体竞争的抗体。

15 2. 权利要求 1 所述的抗体,该抗体是单克隆抗体。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体,该抗体是由保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的抗体。

20 4. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 3 任一项所述的抗体作为活性成分。

5. 权利要求 4 所述的药物组合物,它可有效抵抗至少一种下述疾病:肿瘤诱导的骨软化症,ADHR, XLH, 肾性骨营养不良,透析骨病,骨质疏松症,低磷酸盐血症,佝偻病,骨软化症,肾小管功能障碍,骨量减少,低钙血症,骨生长障碍,骨钙化功能障碍,甲状旁腺功能亢进症,异位钙化,搔痒,骨硬化,佩吉特氏病,高钙血特发性综合症,甲状旁腺功能减退症,骨痛,肌力下降,骨骼畸形,发育不良和维生素 D 缺乏症。

6. 权利要求 5 所述的药物组合物,它可有效抵抗至少一种下述的疾病:肿瘤诱导的骨软化症, XLH, 低磷酸盐血症,骨质疏松症,
30 骨生长障碍,骨钙化功能障碍和骨软化症。

7. 一种促进骨生成的药剂,其包含权利要求 1 至 3 任一项所述

的抗体作为活性成分。

8. 权利要求 4 至 6 中任一项的药物组合物，其包含至少 2 种可识别不同位点的如权利要求 1 所述的抗体。

9. 根据权利要求 4 所述的药物组合物，其中的抗体可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的一段氨基酸序列。

10. 一种检测成纤维细胞生长因子-23 的方法，该方法包括使识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体，和一种识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体，与测试样品发生反应。

11. 权利要求 10 所述的检测方法，其中识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体是一种识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 196 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的抗体。

12. 根据权利要求 10 所述的检测方法，该方法利用了凝血酶抑制剂。

13. 根据权利要求 10 或 11 所述的检测方法，其中的抗体是由保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的。

14. 一种检测成纤维细胞生长因子-23 的试剂盒，该试剂盒包含识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体，和识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体。

15. 权利要求 14 所述的试剂盒，其中识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体是识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 196 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的抗体。

16. 权利要求 14 或 15 所述的试剂盒，其中的抗体是由保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的。

17. 一种抗成纤维细胞生长因子-23 的抗体结合物质, 该物质可结合至少一种选自权利要求 1 至 3 的抗体。

18. 一种医疗器具, 其装备有权利要求 17 中所述的结合物质。

19. 根据权利要求 18 中所述的医疗器具, 该器具被用于除去血液中的成纤维细胞生长因子-23。

抗成纤维细胞生长因子 23 的抗体

5 技术领域

本发明涉及抗成纤维细胞生长因子-23(FGF-23)的抗体。

更具体地说,本发明涉及一些抗体,它们提供通过适当地检测和测定 FGF-23 而诊断 FGF-23 蛋白在体内积累或降低所伴随的疾病或病理状态的方法,所述方法能够通过阻遏 FGF-23 而改善或治疗由 FGF-23 过量的作用导致的疾病的症状或病理状态,本发明同时涉及制备抗体的方法和利用抗体的方法。

背景技术

成纤维细胞生长因子是首次作为刺激成纤维细胞系 NIH3T3 的物质从小牛的垂体纯化的。然后,在各种组织中鉴定了类似的蛋白,一组这些物质形成了多肽家族(FGF 家族)。至今,属于 FGF 家族的 22 个类型的蛋白已经在脊椎动物中鉴定。关于这些类型的蛋白的生物学活性,不仅成纤维细胞生长刺激活性而且大范围的作用也是已知的,如发育期间中胚层和神经外胚层的生长,血管发生,肢芽的形成。FGF 家族成员是关于基因的表达位点和表达时间而变更的。在发育时期或成人中经常只在特定的位点表达其基因。作为编码 FGF 受体的基因,至少有 4 个类型是已知的:FGFR1,FGFR2,FGFR3 和 FGFR4。另外,已知在 FGFR1, FGFR2 和 FGFR3 中,由于拼接的不同,在受体蛋白的细胞外的结构域中的差异是独立存在的。另外,已知肝素和类肝素(heparan)硫酸糖蛋白与 FGF 和 FGF 受体反应,以便调节其作用。另外,有许多蛋白由于其结构上的相似性属于 FGF 家族,但它们的生物活性,它们的受体结合能力等等仍然几乎是未知的。FGF 家族的表征已经如综述所述完成(Ornitz, D.M. 和 Itoh N., 成纤维细胞生长因子,基因组生物学 2: 3005.1-3005.12, 2001)。

FGF-23 首先是通过数据库检索,利用它与 FGF-15 的同源性和 PCR 方法,从小鼠中克隆的,然后,利用它与小鼠 FGF-23 的序列同源性来克隆人 FGF-23 (Yamashita T., Yoshioka M., 和 Itoh N., 新成纤维

细胞生长因子 FGF-23 的鉴定，其在脑的腹侧丘脑核中优先表达，*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277:494-498, 2000)。随后，根据对常染色体显性的低磷酸盐血症性(hypophosphatemic)佝偻病/骨软化症（下文中称为 ADHR）的研究，在 ADHR 患者的 FGF-23 基因中特征性地发现错义突变，同时使 ADHR 患者中突变基因的区域变窄并且鉴定了致病基因（ADHR 协会，常染色体显性低磷酸盐血症性佝偻病是与 FGF-23 的突变相关的，*Nature Genet.* 26: 345 - 348, 2000）。这一发现明显地表明了体内 FGF-23 的生理重要性。但是，FGF-23 的生物学活性仍然是未知的。同时，通过对肿瘤诱导的骨软化症的研究已经确定了 FGF-23 的生物活性。可以认为，在这一疾病中，与疾病有关的肿瘤产生了并且分泌了诱导疾病的体液因子，并且通过这一因子的作用，发生了疾病，如低磷酸盐血症(hypophosphatemia)或软骨病。

在寻找这样的致病肿瘤产生的疾病诱导因子中，FGF-23 已经作为肿瘤中高水平表达的基因来克隆。另外，已经显示，通过施用这一因子，再现了(reproduced)低磷酸盐血症和骨软化症（Shimada T., Mizutani S., Muto T., Yoneya T., Hino R., Takeda S., Takeuchi Y., Fujita T., Fukumoto S 和 Yamashita T., 作为肿瘤诱导的骨软化症的成因因子的 FGF-23 的克隆和表征，*美国国家科学院院刊* 98: 6500 - 6505, 2001）。这一研究显示了 FGF-23 参与了与磷和钙有关的体内代谢控制，并且表明，FGF-23 作为系统性因子表现其作用，同时在体内循环。但是，表现 FGF-23 作用所需要的体内浓度和代谢并未被显示，FGF-23 的生理作用仍然大部分未知。另外，作为呈现临床发现有类似症状的疾病，与性连遗传型(X-linked)低磷酸盐血症性佝偻病是已知的。但是，还没有发现发病过程中 FGF-23 的参与。除了 ADHR 和肿瘤诱导的骨软化症，还没有已知的疾病被证明是与 FGF-23 相关的。

通过显示异常低水平的血磷和 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D（下文中称为 $1,25D$ ）以及肿瘤的发生可以表征上面的肿瘤诱导的骨软化症。该病症伴随肌肉力量降低或骨软化症，可以导致步行障碍或起立困难。在大多数情况中，导致(responsible)这一疾病的肿瘤是从间充质细胞(mesenchymal cells)派生的良性肿瘤。大多数致病肿瘤生长能力较弱，

并且在随访中很少观察到明显的增大。另外，虽然观察到了发病(morbidity)的进展，通常需要详细的检测如全身MRI扫描检测来发现致病(responsible)肿瘤。因此，对于没有给出明确诊断，或者作出由未知原因导致低磷酸盐血症的一些情况，怀疑它们是肿瘤诱导的骨软化症。目前，对肿瘤诱导的骨软化症的唯一经证实的诊断方法是证明通过肿瘤切除术(tumorectomy)从疾病症状中恢复。这是因为还没有通过临床实验检测肿瘤发生与疾病症状的成因和效果关系的方法。在一些情况中，进行了完全与疾病症状无关的非致病性肿瘤的去除。为了改进这些情况，人们期望开发临床实验的方法，从而可以进行肿瘤诱导的骨软化症的差异(differential)诊断。

已经发现了 FGF-23 在体内具有控制磷代谢作用。已知具有控制磷代谢作用的甲状旁腺激素和 1,25D 在钙代谢而不是磷代谢的控制中起更重要的作用。主要控制磷代谢的分子还没有发现，而 FGF-23 可以期望具有这样的活性。同时，磷代谢和钙代谢之间的密切关系在临床上已是已知的。特别是，关于骨组织的钙化和病理异位钙化，将两者分开考虑是困难的。基于 FGF-23 在过量状态时可诱导骨软化症和其具有降低 1,25D 作用的事实，FGF-23 不仅可能与磷的代谢有关，而且还可能广泛地与控制钙化和骨代谢有关。此外，在主要包括肠道、肾和骨组织的控制矿物质代谢的器官中的异常性疾病可能与 FGF-23 的过量积累和缺乏有关。人们期望发展一种测定体内 FGF-23 浓度的方法以利于了解上述疾病，以及对该疾病进行精确的治疗。

从由过量 FGF-23 诱导的发病体中抑制或除掉 FGF-23 可以成为治疗该疾病的一种方法。一种可能的方法是利用 FGF-23 的受体的拮抗物或者可结合 FGF-23 的物质来抑制配体-受体的相互作用，另外一种可能的方法是利用一种可结合 FGF-23 的物质除去 FGF-23。然而，利用上述方法有选择性地抑制或除去 FGF-23 的物质还未发现。

发明概述

本发明的一个目的是提供可识别 FGF-23 的抗体，诊断方法，有效的治疗方法，和利用所述抗体抵抗由 FGF-23 引发的疾病的预防方法。

为了达到上述目标，我们进行了大量的研究，目前该发明已经得

到了一种抗体，该抗体可特异性识别并与 FGF-23 蛋白的部分结构相结合，并且我们发现利用该抗体可检测 FGF-23。

本发明如下：

(1) 通过利用多肽免疫动物而得到的抗体，所述多肽包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，或包含从 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中通过缺失、替代或添加一个或几个氨基酸而衍生得到的氨基酸序列，并且所述抗体具有成纤维细胞生长因子-23 的活性，具有控制磷酸盐代谢或维生素 D 代谢的活性，并且如以下(a)、(b)或(c)所示：

(a) 识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 194 位，或第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的一段氨基酸序列的抗体；

(b) 由保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的抗体；或

(c) 通过结合由 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列所组成的多肽，与保藏号为 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268 的杂交瘤所产生的抗体竞争的抗体。

(2) 一种药物组合物，其包含上述抗体作为活性成分。

本发明的药物组合物包含一种可识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的抗体。本发明的药物组合物可有效地抵抗至少一种下述的疾病：肿瘤诱导骨软化症，ADHR，XLH，肾性骨营养不良，透析性骨病，骨质疏松症，低磷酸盐血症，佝偻病，骨软化症，肾小管机能障碍，骨量减少，低钙血症，骨延长障碍，骨钙化障碍，甲状旁腺功能亢进症，异位钙化，搔痒，骨硬化，佩吉特氏病，高钙血特发性综合症，甲状旁腺功能减退症，骨痛，肌力下降，骨骼畸形，发育不良，和低 1,25D 疾病（血液中 1,25D 低于某一水平的疾病），并且能用于治疗或预防这些疾病。

该药物组合物包含一种药剂，该药剂利用上述抗体作为活性组分可促进骨的生成。

(3) 一种检测成纤维细胞生长因子 - 23 的方法，包括使识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体，和一种可识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体，与测试样品

发生反应。

用于上述检测方法中的识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体是一种识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 和第 196 位氨基酸残基之间的氨基酸
5 序列的抗体。此外,本发明的检测方法中也使用了一种凝血酶抑制剂。

(4) 一种检测成纤维细胞生长因子-23 的试剂盒,它包含识别如 SEQ ID NO:1 所示介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体,和识别如 SEQ ID NO:1 所示介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体。

10 本发明的试剂盒包含识别如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸残基中的介于第 180 位和第 196 位之间的氨基酸序列的抗体,作为识别如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸残基中的介于第 180 位和第 251 位之间的部分氨基酸序列的抗体。

(5) 一种抗成纤维细胞生长因子-23 抗体的结合物质,该物质至少结合一种选自上面的抗体。
15

(6) 一种医疗器具,装备有上述结合物质。本发明提供的这种医疗器具能用于除去血液中的成纤维细胞生长因子-23。

(7) 一种药物组合物,该药物组合物包含至少 2 种如上所述的可识别不同位点的抗体作为活性成分。

20 本发明的详细介绍如下:

已知 FGF-23 在致病肿瘤诱导的骨软化症的肿瘤中可高水平地表达。当分泌 FGF-23 的细胞被实验性地转移进裸鼠的体内时,低磷酸盐血症或者是骨软化症就发生了,它们都是肿瘤诱导的骨软化症的特征疾病。因此,FGF-23 被认为是肿瘤诱导骨软化症的一种诱导剂。
25 对产生常染色体显性低磷酸盐血症性佝偻病(ADHR)的基因的单独探索和研究已经展开,ADHR 是遗传性低磷酸盐血症的一种模式。因此,FGF-23 被认为是其突变可在 ADHR 病人体内特别观察到的基因。这些结果表明 FGF-23 是造成低磷酸盐血症的一种致病因素。对 FGF-23 的生物学活性,在一种对小鼠施用重组体 FGF-23 的实验中,
30 证明了 FGF-23 可诱导低磷酸盐血症。基于这些结果,可以假定 FGF-23 在体内起到了控制磷代谢和骨代谢的体液因子的作用。因此,定量的

和定性地评价体内的 FGF-23 对理解和诊断疾病具有非常重要的意义。而且，期望控制 FGF-23 的生物学活性不仅能够治愈低磷酸盐血症（上面的描述已经说明了 FGF-23 与低磷酸盐血症有关），而且能够控制磷的代谢和骨的代谢，还能够应用到矿物质代谢异常、代谢性骨病等的治疗上。

通过对本发明中的一些术语的说明来对本发明进行详细描述。

在本发明的说明书和附图中的单字母符号通常用于表示氨基酸，其表述如下：(G) 甘氨酸，(A) 丙氨酸，(V) 缬氨酸，(L) 亮氨酸，(I) 异亮氨酸，(S) 丝氨酸，(T) 苏氨酸，(D) 天门冬氨酸，(E) 谷氨酸，(N) 天门冬酰胺，(Q) 谷氨酰胺，(K) 赖氨酸，(R) 精氨酸，(C) 半胱氨酸，(M) 甲硫氨酸，(F) 苯基丙氨酸，(Y) 酪氨酸，(W) 色氨酸，(H) 组氨酸，和(P) 脯氨酸。另外，单字母符号的意义通常也用于表示 DNA 的构成物，表述如下：(A) 腺嘌呤，(C) 胞嘧啶，(G) 鸟嘌呤，和(T)胸腺嘧啶。

15 活性控制磷酸盐(activity controlling phosphate)指的是血液中活性控制磷酸盐浓度。

活性控制维生素 D 代谢(activity controlling vitamin D metabolism)的是指存在于体内的维生素 D 和在体内利用维生素 D 合成的代谢物的绝对水平的变化，或者是指控制维生素 D 存在率变化的潜能。

20 1. 抗体识别 FGF-23

在本发明中所用的人类 FGF-23 是一种具有如下面描述的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)，并且具有上面所述的特性（活性）的多肽。此外，本发明中的 FGF-23 和它的一部分包含一种人类 FGF-23 的衍生物（该衍生物在一级结构方面与天然类型的 FGF-23 具有基本上相同的氨基酸序列），和人类 FGF-23 的衍生物的一部分，只要是在本发明中后面所描述的抗体具有反应活性。

25 这里，“具有基本上相同氨基酸序列的人类 FGF-23 衍生物”这一术语指的是一种具有通过替代，缺失和/或修饰一个或几个氨基酸而衍生得到的氨基酸序列的蛋白，条件是该蛋白具有与天然类型的人类 FGF-23 基本上相同的特性（活性）。而且，多个替代、缺失、修饰和添加可结合使用。人类 FGF-23 的活性指的是能够诱导类似于上

述情况的低磷酸盐血症或骨软化症的活性。

本发明的人类 FGF-23 可以用本领域已知的方法适当地制备，比如，除基因重组技术外，有化学合成方法，细胞培养方法，或这些方法的改进方法。而且，人类 FGF-23 的一部分序列也能够利用基因重组技术，或按照如下描述的技术领域中一种已知的方法，如化学合成的方法，或这些方法的改进方法来制备，或者可利用蛋白水解酶适当地切割通过细胞培养方法分离的人类 FGF-23 的方法来制备。

本发明中的抗体是一种对上面所定义的人类 FGF-23 或其一部分具有反应活性的抗体，或是这种抗体的一部分。本发明的抗体包括单克隆抗体，该单克隆抗体包含重链和/或轻链，其氨基酸序列通过一个或几个氨基酸的缺失、替代或添加衍生于组成抗体的每一条重链和/或轻链的氨基酸序列，并且可与 FGF-23 相结合。上面描述的氨基酸的部分变化（缺失，替代，插入和添加）能通过部分改变编码氨基酸序列的核苷酸序列被引入到人类 FGF-23 的氨基酸序列或本发明的抗体中。用于这些变化的技术对本领域技术人员是已知，并且可使用用于引入突变等的商业化试剂盒。

(1) 能特异性识别并能与 FGF-23 蛋白部分结构结合的抗体

为了获得一种用于测定 FGF-23 和控制 FGF-23 的生物学活性的抗体，获得可识别 FGF-23 结构特征的抗体，对 FGF-23 有高度的亲和力的抗体，能中和生物活性的抗体等等是有效的。由于 FGF-23 的结构和抗原性是未知的，所以合成了相应于 FGF-23 部分序列的许多肽，并且得到了针对每一种肽的抗体。利用这些抗体通过 Western 印迹法测定了由表达细胞分泌的 FGF-23，揭示了表达细胞培养物上清液中除成熟的 FGF-23 蛋白外，包含大量低分子量的肽，这些肽是由 FGF-23 蛋白衍生得到的。而且，所获得的抗体表现出了抵抗成熟的 FGF-23 和由成熟的 FGF-23 切割产生的肽的各种结合特异性。

此外，利用免疫沉淀方法发现了该抗体在液相中的结合活性。而且，联合使用这些位点特异性抗体使得对从 FGF-23 中衍生得到的各种各样的肽中检测出具有特定序列区域的肽成为可能。关于 FGF-23 的修饰和代谢的细节仍然未知。我们通过利用本发明的各种抗体进行检测实验，证明了当 FGF-23 在 CHO 细胞中表达时，不仅存在没有

信号序列的全长蛋白，而且存在由于第 179 位精氨酸残基和第 180 位丝氨酸残基之间切割产生的代谢产物。除此以外，通过采集血浆的血样和含有 FGF-23 的血清的血样，和检测代谢物的实验，以及将纯化后的重组体与血清混合的实验，我们还揭示了虽然 FGF-23 在血浆中以全长形式存在，在血清中，FGF-23 的第 196 位精氨酸残基和第 197 位丙氨酸残基之间会发生切割。这可能是由于凝血酶的原因，切割也在第 198 位精氨酸和第 199 位甲硫氨酸之间发生。

(2) 抗体的产生

作为例子，通过下面的生产方法可以产生本发明的抗体。具体地说，例如，对一种非人类的哺乳动物，例如产生人抗体的转基因小鼠，利用结合上面定义的人 FGF-23 或其一部分的产物，或它们与适当的物质（例如，小牛血清白蛋白）的结合复合物进行免疫，来增强抗原以及佐剂（如果需要的话，例如费氏佐剂）的抗原性。或者，通过施用其中掺入了 FGF-23 的表达载体进行免疫。从免疫动物得到的血清可以得到多克隆抗体。此外，单克隆抗体能够通过下述过程产生：从由被免疫的动物获得的产生抗体的细胞，和不能自身产生抗体的骨髓瘤细胞制备杂交瘤，克隆这些杂交瘤，并且筛选产生对免疫所用抗原有特异亲和性的单克隆抗体的克隆。

更具体地说，单克隆抗体可利用下面描述的方法来进行生产。分泌的单克隆抗体的杂交瘤可通过并按照 Köhler 和 Milstein 等人的方法（Nature, 1975, 256 卷, 495-497）来制备。具体地说，杂交瘤是通过融合如上所述被免疫的动物的脾脏、淋巴结、骨髓、扁桃体，优选淋巴结或脾脏中包含的抗体产生细胞，和不能生产优选来源于哺乳动物，如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔子或者人的抗体的骨髓瘤细胞来制备。筛选产生单克隆抗体的杂交瘤克隆可通过例如在微量滴定平板里培养杂交瘤，在培养物的上清液里检测其对免疫原的反应活性，其中利用酶免疫测定方法，比如酶联免疫特异性测定(ELISA)观察到其生长。

单克隆抗体能从杂交瘤中产生，方法是体外培养杂交瘤并且从培养上清中分离抗体，或体内培养杂交瘤，例如在小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠或者兔子的腹水中进行培养，然后从腹水中分离抗体。

另外，重组抗体可以通过以下方法制备：从一种抗体生产细胞，比如杂交瘤中克隆编码人类单克隆抗体的基因，将该基因整合到合适的载体上，再将载体引入到宿主（例如，哺乳动物细胞系，大肠杆菌，酵母细胞，昆虫细胞和植物细胞）中，然后利用基因重组技术生成抗体（P.J. Delves, 抗体生产基本技术, 1997 WILEY; P Shepherd 和 C Dean, 单克隆抗体, 2000 年, 牛津大学出版社, J.W. Goding, 单克隆抗体, 原理和应用, 1993 学术出版社）。而且，利用转基因动物生产技术将一靶抗体基因整合到内源基因上，从而产生转基因牛，山羊，绵羊或猪，然后可由转基因动物的乳汁中大量获得抗体基因衍生出的单克隆抗体。当在体外培养杂交瘤时，可以依照各种各样的条件进行培养，这些条件包括待培养细胞类型的特性，实验和研究的目的，培养方法等等，可以利用已知类型的营养培养基生长、维持和贮藏杂交瘤，所述营养培养基可以用于在培养物上清液中产生单克隆抗体，或是从已知的基本培养基中诱导和制备的任何类型的营养培养基。

关于本发明的多克隆抗体，如实施例 5 所示，将一种化学合成的 FGF-23 的部分肽与一种牛甲状腺球蛋白（载体蛋白）相结合，再利用该产物对兔子免疫。然后利用亲和层析柱对这种抗体（该抗体通过免疫接种已诱导其抵抗各种肽的作用）进行纯化，用于免疫接种的肽已经被固定化在层析柱上。这样得到的抗体的特性通过 Western 印迹法和 ELISA 方法进行了检测，可以清楚地得到其抵抗 FGF-23 蛋白的反应活性。

关于制备本发明的单克隆抗体，可以通过两种方法进行免疫接种，如实施例 3 所示。对这样获得的杂交瘤产生出的单克隆抗体的特性，即，抵抗固定化的 FGF-23 部分肽的反应活性（如实施例 9 所示），在免疫沉淀实验中抵抗 FGF-23 蛋白的反应活性（如实施例 10 所示），进行了测定，以便揭示每一种抗体同 FGF-23 的结合特性和识别位点的专一性。

2. 检测 FGF-23 的方法

(1) 从生物学样品中定量检测和鉴别 FGF-23 与其代谢产物

在临床试验中，必须对生物学样品中的 FGF-23 的活性进行精确测定。然而，由 FGF-23 生成的 FGF-23 蛋白的切割或由血样制备的

FGF-23 蛋白的切割产生的片段化产物（这些我们已经观察到），可能是妨碍 FGF-23 的测定的因素。具体地说，我们的试验已表明，如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割导致了活性的丧失。因此，为了检测在生物学样品中具有活性的 FGF-23，利用一种可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的部分氨基酸序列的抗体和一种可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的抗体的组合的夹心式(sandwich) ELISA 方法是有效的。这种检测方法能够通过将 2C3B 抗体或 2C5L 抗体（我们已经得到了这种 N-末端识别抗体）与 3C1E 抗体或 1D6A 抗体（C-末端识别抗体）相结合来进行（见图 5）。而且，当利用血清样品制备血样时，存在于血中的全长 FGF-23 在介于第 196 位和第 197 位氨基酸残基之间或介于第 198 位和第 199 位氨基酸残基之间的位置可能发生切割。在这一情况下，当使用一种可识别位于 C-末端上的第 197 位和该位置后的氨基酸残基部分的抗体时，利用这种方法不能对反映存在于血液中的这种蛋白的原始量进行测定。由于即使使用了血清样品，在血浆中也不能观察到这种切割（见实施例 26），而如利用我们所得到的可以识别处于第 180 位和第 196 位氨基酸残基之间的一个位点的 3C1E 抗体，作为识别 C-末端的抗体，可以使得测定反映存在于血液中的蛋白的原始量的方法成为可能。

另外，在制备一个血清样品时，凝血酶被证明是一种可以切割 FGF-23 的酶（见实施例 17）。因此，在制备血清样品时，通过加入凝血酶抑制剂，可避免检测中的 FGF-23 的切割产生的效果，使得抑制伴随血清样品的制备的 FGF-23 的大部分切割是可能的。凝血酶抑制剂可以是任何不妨碍 FGF-23 检测的物质，并且优选是水蛭素。

而且，本申请涉及检测 FGF-23 的试剂盒，该试剂盒含有一种可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的一部分的抗体和一种可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的一部分的抗体。本申请中检测 FGF-23 的试剂盒中除了包括抗 FGF-23 抗体之外，如有必要的话，还可包括稳定剂、pH 调节剂等。

(2) 高灵敏度检测 FGF-23 的方法

阐明 FGF-23 的体内作用和发病率之间的关系在临床上是有意义的，并且对肿瘤诱导骨软化症的差异诊断和遗传性低磷酸盐血症佝偻病（ADHR, XLH: 性连遗传型低磷酸盐血症佝偻病）的诊断也是有意义的。低磷酸盐血症，佝偻病，和骨软化症，对已证实没有营养不良和家族病史的病人来说，是不能够确定病因的疾病，因此对该疾病的诊断在目前很困难。只有检测到上述患者血液中 FGF-23 的浓度升高时，才有可能基于基因突变的确认，通过遗传性疾病的差异诊断，或者利用一种检测肿瘤的详细方法来发现肿瘤，使拟定治疗肿瘤诱导的骨软化症的治疗方案成为可能。而且，由于 FGF-23 作为一种控制磷代谢的因子和/或控制维生素 D 代谢的因子可能与生物功能紧密相关，因此认为血液浓度在矿物质代谢异常，肾功能障碍，骨代谢疾病等的病症中是波动的。因此，将健康的成年人血液中 FGF-23 浓度的平均值同患有上述疾病的患者体内血液中 FGF-23 浓度的平均值相比，对于我们了解发病原因，选择治疗方法，和确定治疗方案是有意义的。为了构建这样一种 FGF-23 的测定系统，需要能够对血液中 FGF-23 浓度进行检测的检测灵敏度。我们已经利用夹心式 ELISA 方法检测了我们所得到的各种各样的抗体组合，使得我们能够定量测定健康的人体血液中和患有上述疾病的患者的血液中的 FGF-23 的浓度。

利用抗体检测能够被抗体识别的物质（指的是一种抗原分子）的方法的实例，包括利用抗体与抗原分子相结合来采集达到可检测数量的底物的方法，通过检测与待测抗原分子特异性结合的抗体来检测抗原分子存在的方法，和通过检测待测抗原分子与已知数量的底物和抗体特异性结合之间的竞争来测定抗原分子的存在的方法。利用 Western 印迹方法，免疫沉淀方法，和免疫染色法可进行定性测定。而且，已知的定量检测方法的实例包括放射免疫法，ELISA 法，荧光激活细胞分类法(FACS)等。当被修饰或切割时，被抗体识别的抗原可以为多种形式。作为一种包括使其其中的一部分形式专一化的检测方法，将可识别靶物质不同位点的抗体进行组合是有效的。这种方法的代表性例子是夹心式 ELISA 法。

基于本发明检测 FGF-23 的方法的完成, 在图 1A 中明确地表示了由于 FGF-23 蛋白的切割而导致产生许多分子物种(species)。尤其是, 实施例 16 所示表明, FGF-23 在血液中以全长蛋白的形式存在, 而在血清中被切割。正因为如此, 考虑到这种切割, 为了在体内定量和精确地检测 FGF-23, 有必要发展一种检测系统。为达到这一目的, 组合使用可识别 FGF-23 蛋白部分序列的上述抗体被证明非常有用。关于利用多克隆抗体的 ELISA 技术, 如实施例 7 所示, 表明 FGF-23 蛋白和其已切割的片段是可以选择性地测定的。另外, 关于实施例 3 和实施例 4 中得到的抗 FGF-23 的单克隆抗体, 其对 FGF-23 蛋白上的识别位点的专一性被分析了, 证明了其与 FGF-23 结合的特性可应用于夹心式 ELISA 技术。实验揭示了在获得的抗体中, 1D6A 抗体, 2C3B 抗体, 和 3C1E 抗体均可独立作为固定化的抗体, 并也能被当作检测用的抗体。另一方面, 2A2B 抗体不适于任何这样的用途。而且, 实验表明, 在体内和在制备血清时 FGF-23 蛋白均可被切割。通过组合使用可分别识别如 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白中的介于第 25 位和第 179 位氨基酸之间的一段序列的抗体, 识别介于第 180 位和第 196 位氨基酸之间的一段序列的抗体, 和识别介于第 197 位和第 251 位氨基酸之间的一段序列的抗体, 可以实现 FGF-23 蛋白的代谢物的检测和测定。在本发明的抗体中, 2C3B 抗体可识别如 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白中的介于第 25 位和第 179 位氨基酸之间的一段序列, 3C1E 抗体可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 196 位氨基酸之间的一段序列。1D6A 抗体可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 237 位和第 251 位氨基酸之间的一段序列。需要特别指出的是, 为了临床实验等目的而检测具有活性的 FGF-23 蛋白, 根据制备血清时出现的切割现象, 最好使用可识别介于第 25 位和第 179 位氨基酸之间的一段序列的抗体和可识别介于第 180 位和第 196 位氨基酸之间的一段序列的抗体的组合。特别地, 利用 2C3B 抗体或者 2C5L 抗体作为固定化抗体, 用 3C1E 作为检测抗体, 可以实现高灵敏度的检测系统。而且, 为了检测全长 FGF-23 蛋白, 最好使用可识别介于第 25 位和第 179 位氨基酸之间的一段序列的抗体和可识别介于第 237 位和第 251 位氨基酸之间的一段序列的抗体的组合。尤其是, 利用

2C3B 抗体作为固定化抗体，1D6A 抗体作为检测抗体，可实现高灵敏度的检测系统。

3. 低磷酸盐血症，佝偻病和骨软化症的诊断方法

- 已有人提出，在 ADHR 病人中，FGF-23 基因的错义突变参与了低磷酸盐血症的诱导（ADHR 协会，常染色体显性的低磷酸盐血症佝偻病与 FGF23 突变有关，Nature Genet. 26: 345 - 348, 2000）。另外，我们已经鉴定 FGF-23 是一种疾病诱导因子，从而在肿瘤诱导的骨软化症中会产生肿瘤（Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, 和 Yamashita T., 对作为肿瘤诱导的骨软化症的致病因子的 FGF23 的克隆与表征，美国国家科学院院刊，98: 6500-6505, 2001）。这些研究表明 FGF-23 可能参与了低磷酸盐血症、佝偻病和骨软化症伴随的疾病。但是，尚未有在活的生物体中定量分析 FGF-23 的方法。在本发明中，我们已经建立了如上所述的特异性 FGF-23 检测系统。如实施例 19 中所示利用这种系统，可以定量测定肿瘤切除之前和肿瘤切除后从患有肿瘤诱导的骨软化症的患者中采集到的血样中所含的 FGF-23。如图 14B 所显示的，虽然手术前表现出明显高的血液 FGF-23 水平，但是肿瘤切除之后，血液中 FGF-23 的浓度降低至近检测极限值。在肿瘤诱导的骨软化症中，肿瘤一般较小，虽然诸如低磷酸盐血症，肌力下降，骨痛，或者骨软化症的病症显现出来，但是没有发现致病性肿瘤。除此之外，当肿瘤被观察到时，不可能确定肿瘤是否产生 FGF-23，以至于区分肿瘤诱导的骨软化症和表现出相似症状的其它血磷酸盐过少疾病的诊断是非常困难的。本发明中的测定方法使得从肿瘤诱导的骨软化症患者的血液中检测出 FGF-23 的增长值成为可能，因此就能够对一些用传统方法检测不出来的疾病进行诊断。

- XLH, 一种在遗传性低磷酸盐血症患者中发病率最高的疾病，据说每两万人中就有大约 1 例。造成 XLH 疾病的基因被鉴定为 PHEX 基因。该基因包含 22 个外显子，基因区跨越 220 个 kb，使得目前分析导致这种遗传性低磷酸盐血症的突变来用于诊断的目的还不可能。该疾病发生突然，并且以在成人中发病为特征的类型已经有过报道。迄今为止，PHEX 基因和 FGF-23 的关系尚未澄清。一种 Hyp 小鼠是

已知的，它是一种自发性突变的小鼠，可作为 XLH 的模型动物。在这种小鼠中，已证实 PHEX 基因的 3'区缺失，并且已知该小鼠会发展成低磷酸盐血症，佝偻病或骨软化症。利用本发明中的测定系统，如实施例 23 所示，我们测定了 Hyp 小鼠中 FGF-23 的血液浓度，发现其中 FGF-23 的浓度非常高。

相应于此，本发明的抗体，和利用该抗体的检测方法或测定方法使得能够诊断肿瘤诱导的骨软化症和 XLH。另外，应该考虑本发明中的测定方法也可用于 ADHR，该疾病是低磷酸盐血症的另一种形式，可能是由于 FGF-23 中的变异引起。

FGF-23 具有降低血液中的磷浓度和 1,25D 浓度的活性。但是，其生理作用尚未得到很好的解释。通过后面所述的中和 FGF-23 活性的实验，我们发现，即使是在正常的情况下，FGF-23 在维持磷或 1,25D 的代谢平衡中发挥了重要的作用。因此，FGF-23 可能参与了磷代谢，并参与了肾脏疾病、肠道疾病、矿物质代谢紊乱和维生素 D 代谢异常的疾病的发生，这些疾病与磷代谢密切相关。而且，给病人施用 1,25D 或它的一种衍生物，FGF-23 的波动可能影响发病和治疗效果。本发明中的测定系统被认为可以加深人们对于这些疾病发病的理解并完成了更为精确的医疗实践。

4. 以抑制 FGF-23 活性为特征的疾病治疗方法

已知，在肿瘤诱导的骨软化症和 ADHR 中，FGF-23 的过度作用诱导了这些疾病。另外，在本发明中，我们也揭示了在 XLH 疾病中，血液中具有高水平的 FGF-23。人们认为抑制 FGF-23 可改善低磷酸盐血症，佝偻病和骨软化症。根据 FGF-23 作用于肾脏的近端小管的上皮细胞的事实，抑制 FGF-23 可能治疗肾小管功能紊乱有意义。另外，根据 FGF-23 在控制磷代谢和维生素 D 代谢中的作用，FGF-23 在与磷代谢异常有关的疾病，与钙代谢异常有关的疾病，与骨代谢异常有关的疾病，伴随肾功能下降的代谢异常疾病，伴随着给肾衰竭病人进行血液透析时的代谢异常疾病，和伴随肾移植过程的疾病中可能发挥了不利的作用。与此类似，有报道说低磷酸盐血症在肾移植后有高发病率，该疾病伴随着骨量减少的症状，表明 FGF-23 也在其中发挥了作用。在这些病例中，不但要将 FGF-23 从异常提高的水平恢复

至正常水平,还需要进一步降低正常值的 FGF-23 作为药理治疗手段。我们认为实施例 27 和实施例 28 中所显示能够中和或者是修饰 FGF-23 活性的抗体对治疗各种疾病是具有重要意义的。如实施例 25 所示,我们发现由于肾功能的下降而出现高磷酸盐血症的动物具有明显高的 FGF-23 水平。据认为伴随着肾功能下降的维生素 D 代谢异常疾病至少一部分是由于 FGF-23 水平升高引起的。另外我们也认为伴随 FGF-23 水平异常升高的疾病能够利用本发明的抗体通过中和或除去 FGF-23 的活性来治疗。需要指出的是,由于磷的代谢,钙的代谢,和维生素 D 的代谢通过利用本发明的抗体进行了改善,这些抗体在抵抗伴随着矿物质代谢异常的疾病,例如低血钙症,甲状旁腺功能亢进,异位钙化,和瘙痒,或者是伴随着肾功能下降的骨代谢异常疾病,例如肾性骨营养不良,和透析性骨病方面可能是有疗效的。而且,利用本发明的抗体在治疗伴随着钙化的心血管机能减退疾病(该疾病是困扰血液透析病人的疾病)方面也可能是有疗效的。此外,如实施例 27 所示,揭示了即使在正常的代谢条件下,FGF-23 在矿物质代谢和维生素 D 代谢中也发挥了非常重要的作用。考虑到 FGF-23 不仅可诱导高磷酸盐血症的事实,而且考虑到 FGF-23 可以快速的降低 1,25D 和通过 1,25D 可快速诱导 FGF-23 的事实,本发明的能中和或修饰 FGF-23 活性的抗体在抵抗矿物质代谢异常的疾病方面可能得到广泛的应用。这是因为该抗体通过抑制 FGF-23 的作用不仅控制磷的代谢,维生素 D 的代谢和钙的代谢,而且间接地控制用于钙代谢的激素,例如甲状旁腺激素和降血钙素。尤其是,本发明的抗体有望在治疗有与矿物质代谢和代谢转换平衡有关各种各样的发病形式的骨质疏松症、骨量减少症、骨硬化症或佩吉特氏病中发挥作用。正如上面所描述的那样,本发明的抗体可抵抗上面所述的一种或多种疾病。

5. 中和 FGF-23 生物学活性的抗体

如上面所描述的那样,FGF-23 被认为具有控制活体代谢的重要作用。控制这样的因子的生物学活性的方法对于治疗和预防各种疾病是有意义的。抗体的特征在于可与抗原分子特异性结合,并已知依赖于其识别位点,其对抗原分子结构和功能有影响。因此,我们以分离和鉴定一种可控制 FGF-23 功能,特别是,能够抑制 FGF-23 的生物

学活性的抗体为目标。如实施例 27 和实施例 28 所示, 我们已经发现将一种可识别 FGF-23 的抗体进行给药后导致了血清中磷的浓度和血清中 1,25D 浓度的升高。特别是, 在这些实施例中使用的本发明的抗体导致人类 FGF-23 的降低血清磷和 1,25D 的活性完全消失, 所述人类 FGF-23 是在小鼠体内实验性地产生的。另外, 在还没有产生人类 FGF-23 的对照小鼠中, 证实了血清中的磷和维生素 D 的水平升高。这一现象与施用 FGF-23 时观察到的变化完全相反。因此, 本发明的这种抗体也被认为能抑制小鼠的内源性 FGF-23。另外, 这一现象表明, FGF-23 作为控制磷代谢和维生素 D 代谢的因子, 不仅在致病状态中, 而且在正常状态中可以起作用。本发明的具有能导致 FGF-23 的生物学活性消失或弱化的抗体能控制生理学状况和病理学病症, 这些病症是 FGF-23 生物学活性的反应。本发明的抗体能够控制的 FGF-23 生物学活性的范围不仅仅局限于磷代谢和维生素 D 的代谢。该抗体能控制 FGF-23 的每一种生物学活性和生理学活性。

此外, 如实施例 31 所示, 可利用识别 FGF-23 不同位点的两种或多种类型的抗体, 即不同的抗原决定部位。在这一情况下, 抗体的中和活性被提高了, 这样抗体的作用时间也能够维持一段较长的时间。两种或多种类型抗体组合的实例, 包括可识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 180 位和第 194 位或介于第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的氨基酸序列的抗体, 和通过杂交瘤产生的抗体, 所述杂交瘤的保藏号是 FERM BP-7838, FERM BP-7839, FERM BP-7840, 或 FERM BP-8268。

6. 包含抗 FGF-23 抗体的药物组合物

本发明的抗体或者是药物组合物能应用于由 FGF-23 在体内产生的或涉及细胞表达 FGF-23 的各种疾病或症状的治疗或预防上。本发明的抗体能用于抵抗肿瘤诱导的骨软化症、ADHR 和 XLH 的药物组合物, 并且可望在改善一般在低磷酸盐血症, 骨钙化功能障碍, 骨痛, 肌力下降, 骨骼畸形, 发育不良, 和低 1, 25D 症 (血液中 1, 25D 水平低) 等疾病中观察到的病症方面起作用。正如上面所描述的, FGF-23 在生理状况方面发挥了重要的作用。本发明的抗体能作为一种用于治疗 and 预防由矿物质或维生素 D 代谢异常引起的疾病 (例如骨质疏松

- 症，佝偻病，高钙血特发性综合症，低钙血症，异位钙化，骨硬化，骨生长障碍，骨钙化机能障碍，佩吉特氏病，甲状旁腺功能亢进症，甲状旁腺功能减退症，和瘙痒）的药物组合物，所述治疗和预防是通过控制 FGF-23 的磷代谢控制作用，或由 FGF-23 控制的由维生素 D 的代谢介导的钙代谢控制作用而实现的。而且，对患有肾功能衰竭的患者来说，其血液中 FGF-23 的浓度升高是明确的。因此，本发明的抗体能作为药物组合物用于治疗 and 预防肾功能衰竭或血液透析的并发症，该并发症表现为肾性骨营养不良、透析性骨病、肾小管机能障碍等。
- 10 另外，本发明的抗体结合一种治疗剂后能用作药物组合物。在肿瘤诱导的骨软化症中，已知由于肿瘤过多地产生 FGF-23，诱发病症。目前，唯一的治疗方法包括除掉致病肿瘤。然而，致病肿瘤通常很小。已经有许多研究报道了致病肿瘤最终被高能磁共振成像（MRI）搜索发现的实例。除此以外，还可能有许多因为没有发现肿瘤，而未知致病原因的低磷酸盐血症或骨软化症的诊断实例。本发明的抗体被认为能在这样的疾病中在产生 FGF-23 的肿瘤中积累，这是由于与 FGF-23 的亲合性。作为一种利用上述特性来退变(degenerating)肿瘤的方法，将治疗剂同本发明的抗体相结合是有效的。能与抗体结合的治疗剂的示例有(1)放射性同位素，例如碘(131 碘:131I; 125 碘:125I)，钇(90 钇: 90Y)，铟(111 铟:111In)，和锝(99m 锝: 99mTc) (J. W. Goding, 单克隆抗体：原理和应用，1993 学术出版社)，(2)细菌毒素，例如假单胞菌毒素（假单胞菌外毒素）、白喉毒素和蓖麻毒素，和(3)化学治疗剂，例如氮甲蝶呤、丝裂霉素和加利车霉素(calicheamicin)(D.J. King, 单克隆抗体应用和工程化，1998 T.J. International Ltd, M.L. Grossbard., 基于单克隆抗体治疗癌症，1998 Marcel Dekker Inc)。更优选地，药物前体，例如美登木素生物碱是比较好的选择 (Chari et al., Cancer Res., 1992 52 卷, Liu 等, 美国国家科学院院刊, 1996, 193 卷: 8681)。

- 此外，本发明的范围也包括一种药物制剂，其包含抗人类 FGF-23 抗体的纯化产物。这样的药物制剂除了包含抗体外，优选包含生理学相容的稀释剂或载体，并且可以是混合了其它抗体或者是其它药物(例

如抗菌素)的产品。合适载体的例子包括,但不局限于,生理盐水,磷酸盐缓冲盐水,磷酸盐缓冲盐水葡萄糖溶液,和缓冲生理盐水。抗体可以冷冻并干燥(冷冻干燥),如果需要,上述的缓冲含水溶液可以加到抗体中,这样可以重建和利用该抗体。服药的方法可以是口服或者是非肠道吸收给药方法,包括静脉、肌肉、皮下和腹膜注射或者是药物递送。

当利用本发明的药物组合物对病人进行给药时,每次给药的有效剂量可以选自每千克体重施用介于20ng和200mg之间的剂量。或者,每位病人按体重施用剂量介于0.001到10000mg之间,优选0.005到2000mg之间,更优选0.01至1000mg之间。然而,本发明的药物组合物的剂量并不局限于上述剂量。

7. 包含抗FGF-23抗体的医疗器具(medical appliance)

在血液透析、血浆交换和细胞采集这样的医疗技术中,将活体中的物质从一部分采集到的体液或参与体外循环的体液中除掉、交换、采集。在这样的医疗技术中,可利用本发明的抗体特异性结合FGF-23分子的特性,选择性地除掉活体中的FGF-23分子并选择性地采集表达FGF-23的细胞。在血液透析和血浆交换中,有潜力的治疗方法包括将本发明的抗体固定到与体液接触的部分物质上。作为透析膜的材料,除了纤维素膜以外,合成的聚合物膜,例如聚丙烯腈膜,聚甲基丙烯酸甲酯膜,聚乙烯-乙醇醇膜,聚砜膜,聚酰胺膜,聚醚砜/聚多芳基化合物膜等都可作为血液透析膜使用。对于这样的膜,将抗体通过共价键固定在膜上后,可用于血液透析。而且,可以用填充有结合了抗体的珠子(例如琼脂糖凝胶珠)的柱子分离体液。此外,另一种可能的方法包括将抗体固定在磁性珠上,将该抗体和抗体结合分子混合以提高其结合力,然后利用磁铁收集抗体和靶物质的复合物。利用这样的方法收集到了细胞并且可用于治疗。如上面描述的那样,结合在基物上的本发明的抗体(所述基物适于作为医疗装置)可作为医疗器具。

8. 控制FGF-23分子结构和生物学活性的方法

在体内保持蛋白的生物学活性的重要一点是允许该蛋白在体内维持其三维结构。在生物学因子当中,正像实施例中对胰岛素样生长

因子(IGF)或者是转化生长因子 β (TGF- β)观察到的那样,有许多这样的例子:一种生物学因子在体内与另一种蛋白相结合以控制生物学活性。对 FGF-23 来说,没有已知的结合蛋白。本发明抗体的实例包括 2C3B 抗体,如实施例 9 所示,该抗体被认为不用与部分肽结合,就可强烈识别 FGF-23 的结构。因此可以设想能够通过创造一种这些抗体或抗体的一部分结合到 FGF-23 上的状态,来控制体内 FGF-23 的生物学活性。

9. 有效除去 FGF-23 的方法

肾功能显著下降要求从体内除去尿毒症物质。对于除掉低分子量的尿毒症物质,在临床上是利用透析膜来进行血液透析。然而,除掉高分子量的蛋白在临床上仍是一个问题。本发明的抗体能够用于专一性的除去 FGF-23。和做血液透析一样,将体外循环的血液与一种材料接触,所述材料已固定了本发明的抗体,这样 FGF-23 就能被选择性的除掉。将该抗体作为一种用于治疗 FGF-23 过量存在的疾病的工具是可行的。如实施例 25 所示,基于当肾功能衰竭时 FGF-23 呈现高水平的事实,FGF-23 可能是一种诱导透析性并发症的因素。需要特别指出的是,由于 FGF-23 具有降低 1,25D 的作用,这样 FGF-23 就非常有可能是诱导 1,25D 随肾功能下降而降低的因子。因此,利用本发明的抗体去除透析病人的 FGF-23 的方法可用于透析性并发症的治疗。

如上面描述的那样,我们通过获得不仅能识别 FGF-23,而且能控制涉及 FGF-23 的生理学作用、药理学作用和病理学作用的抗体而完成了本发明,并且所述抗体能用于治疗,预防,和诊断疾病。

10. 竞争性抗体的说明

在结合 FGF-23 方面,可识别与本发明的抗体所识别的位点相同的位点,或者与该位点非常接近的位点的抗体被认为显示与本文所示特性等同的特性。这样一种基本上等同的抗体能通过进行与竞争性相关的试验来和其它的抗体相区别。当允许 2 种或多种抗体共存时,显示与抗原的结合时相互专一结合的特性的抗体被定义为竞争性抗体。为了明确本发明的竞争性抗体,在被标记的本发明的抗体与 FGF-23 蛋白结合的条件下,使未作标记的抗体过量存在,这样就能进行测定。

当加入的抗体显著地降低了本发明的抗体与 FGF-23 蛋白的结合时，就能够确定加入的抗体同本发明的抗体竞争。

本说明书包括了日本专利申请第 2001-401689 号和第 2002-262020 号的说明书和/或附图中公开的部分或全部内容，上述两项申请是本
5 申请的优先权文本。

附图简述

图 1A 表明了利用抗 FGF-23 的多克隆抗体通过 Western 印迹法对重组体 FGF-23 蛋白和其代谢产物的测定结果，该多克隆抗体利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)经过分离 CHO-
10 FGF23H 细胞培养物的上清液得到。在培养物的上清液中，提供了由在 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割产生的全长 FGF-23H 蛋白，和 N-末端片段和 C-末端片段。利用 hFGF23-48 抗体和 hFGF23-148 抗体对全长 FGF-23H 蛋白和 N-末端片段肽进行了识别。对于 N-末端片段，观察到了小片
15 段肽的存在。对全长蛋白和 N-末端片段利用抗 6 组氨酸标记的抗体 (anti-His6-tag 抗体)进行了测定。(实施例 2)

图 1B 表明了从 CHO-FGF-23 细胞培养物的上清液中纯化出的全长 FGF-23 蛋白，N-末端片段和 C-末端片段，CHO-FGF-23 的细胞培养物上清液利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后通过考马斯亮蓝
20 (CBB)染色后所得到的测定结果。

图 1C 表明了利用一种抗 FGF 23-148 抗体通过 Western 印迹法对一种重组体 FGF-23 蛋白，一种重组体 FGF-23RQ 蛋白，和其代谢产物的测定结果，这种抗 FGF 23-148 抗体是先通过分离 CHO-FGF-23H 细胞和 CHO-FGF - 23RQ 细胞的培养物上清液，然后再利用 SDS-聚
25 丙烯酰胺凝胶电泳分离细胞得到的。(实施例 5)

图 2 表明了利用一种 hFGF23-25 抗体作为固定化抗体，和一种 hFGF23-237 作为检测抗体(这种检测抗体是抗 FGF-23 的多克隆抗体)通过夹心式 ELISA 法对 FGF-23H 蛋白进行测定后所得的结果。
(实施例 7)

30 图 3 表明了利用抗 FGF-23 的单克隆抗体免疫沉淀 FGF-23H 蛋白后，利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离该蛋白，然后利用 2A2B 抗

体和 1C3H 抗体对该蛋白进行检测的结果。（实施例 10）

图 4 表明了利用抗 FGF-23 单克隆抗体作为固定化抗体和抗 FGF-23 多克隆抗体作为检测抗体通过夹心式 ELISA 法对纯化后的 FGF-23H 全长蛋白，N-末端多肽片段和 C-末端多肽片段的测定结果。（实施例 11）

图 5 概略性的表明了全长 FGF-23 蛋白和其切割点，和抗 FGF-23 的单克隆抗体的识别位点。（实施例 12）

图 6 表明了利用 2C3B 抗体作为一种固定化的抗体和 1C3H，1D6A，和 3C1E 抗体作为检测抗体通过 ELISA 系统对纯化后的 FGF-23 蛋白进行定量检测得到的结果。（实施例 13）

图 7 表示了用固定了 1C3H，1D6A，和 2C3B 抗体的树脂将 CHO-FGF23H 细胞转移至裸鼠体中，从该裸鼠中采集血清，通过免疫沉淀方法从血清中采集了 FGF-23H 蛋白，然后通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离该蛋白，最后利用 2A2B 和 1C3H 抗体对蛋白进行检测的结果。（实施例 15）

图 8 表明了向 20ng 纯化后的 FGF-23 蛋白中加入大鼠的血清，获得了最终浓度为 50% 的混合溶液，混合该溶液，然后利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离经过 0，0.5，1，2，4，8，或 24 小时培育后的代谢产物，利用 2A2B 抗体对该代谢产物进行 Western 印迹法测定的结果。（实施例 16）

图 9 表明了向 20ng 纯化后的 FGF-23 蛋白中加入人类的血清或人类的血浆，获得了最终浓度为 50% 的混合溶液，将该混合溶液在 37℃ 的环境中培育 3 小时，然后利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离培养物，利用 2A2B 抗体对该分离物进行 Western 印迹法测定的结果。（实施例 16）

图 10 表明了向 20ng 纯化后的 FGF-23 蛋白中加入凝血酶，获得了最终浓度为 1 单位/毫升的混合溶液，将该混合溶液在 37℃ 的环境中培育 3 小时，然后利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对培育物进行分离，利用 2A2B 抗体对该分离物进行 Western 印迹法测定的结果。（实施例 17）

图 11 表明了向 20ng 纯化后的 FGF-23 蛋白中在添加有或未添加

水蛭素（一种凝血酶选择性抑制剂）的条件下加入大鼠的血清，获得了一种最终浓度为 50 % 的混合溶液，将该混合溶液培育 4 小时，然后利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对培育物进行分离，利用 2A2B 抗体对该分离物进行 Western 印迹法测定的结果。（实施例 17）

5 图 12 表明了将 10 μ g 纯化后的 FGF-23 蛋白和大鼠血清混合 24 小时以产生 22kDa（一种分子量单位，为千道尔顿）的多肽，利用抗 2A2B 抗体柱纯化这种 22kDa 多肽，然后利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化后的产物进行分离，再通过 CBB 染色法进行鉴别的结果。（实施例 18）

10 图 13 表明了利用 ELISA 系统（该系统利用 2C3B 抗体作为固定化抗体，和 3C1E 抗体或者是 1D6A 抗体作为检测抗体来进行检测）测定的血液样品中 FGF-23 蛋白的测定结果，该蛋白采集自患有肿瘤性骨软化症的病人体内中的致病性肿瘤提取前和提取后的血样。（实施例 19）

15 图 14 表明了对血液样品中 FGF-23 蛋白的定量测定结果，该蛋白采集自患有肿瘤性骨软化症的病人体内中的致病性肿瘤提取前和提取后的血样。（实施例 19）

图 15 表明了利用免疫组织学染色法测定的肿瘤组织中在 FGF-23 蛋白存在时的结果，该肿瘤组织采集自患有肿瘤性骨软化症的患者。

20 （实施例 20）

图 16A 表明了利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化后的小鼠 FGF-23RQ 蛋白，然后利用 3C1E 抗体（该抗体是一种抗人类 FGF-23 的单克隆抗体）通过 Western 印迹法对小鼠的 FGF-23RQ 蛋白进行了测定的结果。（实施例 22）

25 图 16B 表明了利用 2C3B 抗体作为一种固定化抗体和 3C1E 抗体作为一种检测抗体来测定纯化后的小鼠 FGF-23 蛋白经连续稀释后的溶液的结果。（实施例 22）

图 17 表明了利用 2C3B 抗体作为一种固定化抗体，和 3C1E 抗体作为一种检测抗体通过 ELISA 系统对血清中内生性 FGF-23 蛋白进行
30 测定的结果，该血清采集自 27 周至 30 周大的 Hyp 小鼠和对照小鼠。（实施例 23）

图 18A 表明了给 6 个 6 周大的 BALB/c 雄性小鼠进行给药, 剂量为每只小鼠 $5\mu\text{g}$ 经纯化后的 FGF-23 蛋白, 然后分别采集给药 1, 4, 和 9 小时后的血清, 图 18A 表明了对血清中 1,25D 浓度的测定结果。(实施例 24)

5 图 18B 表明了给 6 个 6 周大的 BALB/c 雄性小鼠通过腹腔进行给药, 剂量为每只小鼠 $0.025\mu\text{g}$ 的 1,25D, 然后采集给药 8 小时后的血样, 图 18B 表明了对血清中 FGF-23 的定量测定结果。(实施例 24)

图 19A 表明了给 7 周大的威斯塔氏小鼠服用以 0.75% 的一种比例混合了腺嘌呤的 CE-2 (日本 CLEA 公司), 这样可在威斯塔氏
10 小鼠体中产生一种肾功能衰竭性高磷酸盐血症模式, 给一对照组威斯塔氏小鼠只服用 CE-2 (未混合腺嘌呤)。在给小鼠服用混合了腺嘌呤的药剂 3 周之后, 采集小鼠血样后的血清中磷酸盐浓度的测定结果。(实施例 25)

图 19B 表明了给 7 周大的威斯塔氏小鼠服用以 0.75% 的一种比例
15 混合了腺嘌呤的 CE-2 (日本 CLEA 公司), 这样可在威斯塔氏小鼠体中产生一种肾功能衰竭性高磷酸盐血症模式, 给一对照组威斯塔氏小鼠只服用 CE-2 (未混合腺嘌呤)。在给小鼠服用混合了腺嘌呤的药剂 3 周之后, 采集血样和尿样 (血样采集完后, 将小鼠饲养在代谢性的笼子中, 采集尿样进行 24 小时), 图 19B 表明了对血清中和尿
20 中腺肌酸酐浓度的测定结果。(实施例 25)

图 19C 表明了给 7 周大的威斯塔氏小鼠服用以 0.75% 的一种比例
混合了腺嘌呤的 CE-2 (日本 CLEA 公司), 这样可在威斯塔氏小鼠体中产生一种肾功能衰竭性高磷酸盐血症模式, 给一对照组威斯塔氏小鼠只服用 CE-2。在给小鼠服用混合了腺嘌呤的药剂 3 周之后, 采
25 集小鼠血样, 然后利用 2C3B 抗体作为一种固定化抗体, 和 3C1E 抗体作为一种检测抗体通过 ELISA 系统对血清中的 FGF-23 浓度进行了测定的结果。(实施例 25)

图 20 表明了利用免疫沉淀方法对 FGF-23 蛋白的测定结果, 该
蛋白存在于患有肿瘤性骨软化症的病人体内的血浆中。(实施例 26)

30 图 21A 表明了在接受各种单克隆抗体和一种载体 24 小时后, 对血清中磷酸盐, 钙, 和 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D 的浓度进行测定的结

果。(实施例 27)

图 21B 表明了接种 3C1E 单克隆抗体和一种载体 8 小时后, 对血清中 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D 的浓度进行测定的结果。(实施例 28)

5 图 22A 表明了在一组服用混合腺嘌呤(腺嘌呤组)的药剂和一组服用一般的药剂(对照组)之后第 7 天对血清中 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D 的浓度进行测定的结果。测定结果利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“*”和“**”分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$, 上述内容均为通过 Student-t (一种统计学方法) 进行显著性测定的结果。(实施例 29)

10 图 22B 表明了在一组服用混合腺嘌呤(腺嘌呤组)的药剂和一组服用一般的药剂(对照组)之后第 7 天对血清中 FGF-23 的浓度进行测定的结果。测定结果利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“*”和“**”分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$, 上述内容均为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。(实施例 29)

15 图 22C 是两种浓度的关系图, 两种浓度分别为服用混合了已给出的腺嘌呤(腺嘌呤组)药剂之后第 7 天测定的血清中 FGF-23 的浓度和 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D 的浓度, 该图是通过个体小鼠的测定数据得到的。(实施例 29)

20 图 22D 表明在一组服用混合腺嘌呤(腺嘌呤组)的药剂和一组服用一般的药剂(对照组)之后第 7 天, 在接种 3C1E 抗体或一种载体, 12 小时之后测得的血清中 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D 的浓度变化情况。测定结果利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“*”和“**”分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$, 上述内容均为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。(实施例 29)

25 图 23 显示了患有性连遗传型低磷酸盐血症的 6 位病人的性别, 已鉴定的 phex 基因的突变位点, 被采集患者的年龄, 和血清的 FGF-23 的浓度。(实施例 30)

30 图 24 显示给正常小鼠接种 2 种抗体(2C3B 抗体和 3C1E 抗体)的混合物或一种载体(PBS)之后第 1 天和第 2 天对血清中的磷酸盐浓度。测定值用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“*”和“**”分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$, 上述内容均为通过 Student-t 进行显著性测定的

结果, 上述结果与只给服用载体的组的测定结果进行了比较。“a”和“b”分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$, 上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。(实施例 31)

图 25A 显示的是给野生型小鼠(WT)和 Hyp 小鼠(Hyp)重复接种
5 包含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的抗体(Ab)的混合物, 或一种载体(PBS)后的第 1 天和第 7 天对血液中磷酸盐浓度, 1α , 25-二羟基维生素 D 的浓度, 和碱性磷酸酶总活性。血液中磷的浓度和碱性磷酸酶的活性值测定结果用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“*”和“***”分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$, 上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。血液中 1α , 25-二羟基维生素 D 的浓度通过混合体积相同的从每一组小鼠中采集的血浆样品而制得的血浆进行测定。(实施例 32)

图 25B 显示的是给野生型小鼠(WT)和 Hyp 小鼠(Hyp)用包含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混合物的抗体(Ab), 或一种载体(PBS)进行一次接种后的第 4 天对血液中磷酸盐浓度和 1α , 25-二羟基维生素
15 D 的浓度进行测定的结果。测定结果用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“*”和“***”分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$, 上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。(实施例 32)

图 25C 显示的是用 Wester 印迹法分析从肾脏中制得的肾近位细管刷状缘膜囊(BBMV)中的 NaPi2a 蛋白的表达量的结果(上面), 和
20 给野生型小鼠(WT)和 Hyp 小鼠(Hyp)用包含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体(Ab), 或一种载体(PBS)进行一次接种之后的第 4 天对磷酸盐转移活性测定的结果(下面)。利用测试来校正 BBMV 的蛋白水平, 用于 Western 印迹法 CBB 染色, 染色后 β -肌动蛋白的影像同时显示出来。每个实例中磷酸盐转移活性的测定结果用平均值 $\pm$ 标准偏差和 $n = 3$ 来表示。(实施例 32)

图 25D: 给野生型小鼠(WT)和 Hyp 小鼠(Hyp)用包含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体, 或一种载体(PBS)进行一次接种之后的第 4 天, 从小鼠肾脏中制备 RNA, 利用 Northern (RNA 转移) 吸印技术分析一个 1α OH 基因的表达变化, 图 25D 显示了该基因的表达
30 变化情况。(实施例 32)

图 26 显示了给正常的大鼠接种 3C1E 抗体或一种载体时, 血液

中骨钙素浓度随时间的变化情况。测定结果用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“**”和“***”分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ ，上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。（实施例 33）

图 27 显示了给野生型小鼠(WT)和 Hyp 小鼠(Hyp)接种包含有
5 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体(Ab)，或一种载体(PBS)之后，从小鼠中所提取的股骨，胫骨和肋骨的放大的 X-射线影像。（实施例 32）

图 28 显示的是两种影像的比较，一种影像是给 Hyp 小鼠（Hyp/
抗体）重复接种含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体后，其胫骨
10 近端和股骨远端的骨组织影像，另一种影像是给 Hyp 小鼠（Hyp/载体）和野生型小鼠（WT/载体）服用载体后，其相应位置的组织影像。提取的胫骨和股骨用 Villanueva Bone 染色。将它们植入树脂中，然后制备成一种大约 $5\mu\text{m}$ 厚的非脱钙切片。这些样品被染成不同的颜色：类骨质染成紫色，钙化骨染成亮橙色，低钙化骨染成亮棕色，包
15 埋进树脂中的细胞在可见光下呈亮紫色。（实施例 32）图 29A 显示下组进行卵巢切除：一组小鼠（假切除/PBS）是假切除，施用载体（PBS），一组小鼠（卵巢切除/混合抗体）卵巢切除，施用含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体，或一组小鼠（卵巢切除/PBS）后给其接种载体(PBS)后 2 星期时的血液中骨钙素浓度（IRMA 试剂盒，
20 Immutopics, Inc.）。血液中骨钙素浓度利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“**”和“***”分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ ，上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。（实施例 34）

图 29B 显示了下组进行卵巢切除：一组小鼠（假切除/PBS）是假切除，施用载体(PBS)，一组小鼠（卵巢切除/混合抗体）进行卵巢切
25 除，施用接种含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体，或一组小鼠（卵巢切除/PBS）进行卵巢切除，施用载体(PBS)后 4 星期时血液中骨钙素浓度（IRMA 试剂盒，Immutopics, Inc.）。血液中骨钙素浓度利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。“**”和“***”分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ ，上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。（实
30 施例 34）

图 30A 显示了对如下组进行卵巢切除：一组小鼠（假切除/PBS）

是假切除，给其接种载体(PBS)，一组小鼠（卵巢切除/混合抗体）进行卵巢切除，给其接种含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体，或一组小鼠（卵巢切除/PBS）进行卵巢切除，给其接种载体(PBS)后 4 星期的股骨中的骨盐数量。股骨中的骨盐数量和骨密度利用平均值 + /- 标准偏差来表示。 “*” 和 “***” 分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ ，上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。（实施例 34）

图 30B 显示了对下组进行卵巢切除：一组小鼠（假切除/PBS）是假切除，给其接种载体(PBS)，一组小鼠（卵巢切除/混合抗体）进行卵巢切除，给其接种含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体，或一组小鼠（卵巢切除/PBS）进行卵巢切除，给其接种载体(PBS)。后 4 星期时的骨密度（骨密度计，DCS-600 型，日本阿洛卡公司）。股骨中的骨盐数量和骨密度利用平均值 + /- 标准偏差来表示。“*” 和 “***” 分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ ，上述内容为通过 Student-t 进行显著性测定的结果。（实施例 34）

图 31A 显示了对 Hyp 小鼠（Hyp/载体）重复皮下给药（一星期一次）载体，含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体，量为 4mg/kg 的 Hyp 小鼠（Hyp/抗体低剂量），16mg/kg 的相同的混合物对 Hyp 小鼠（Hyp/低剂量的抗体，16mg/kg 的相同的混合物对 Hyp 小鼠（Hyp/高剂量的抗体）后定期测量尾椎骨的全长的结果。这些结果利用平均值 + /- 标准偏差来表示。“***” 表示 $p < 0.01$ ，其为当测量结果与接种载体的 Hyp 组结果相比较时，通过 Student-t 进行显著性测定而得到的。（实施例 35）

图 31B 同样显示了共分四组的实验，一组 Hyp 小鼠（Hyp/载体）通过皮下注射重复接种载体；一组 Hyp 小鼠（Hyp/低剂量抗体）按 4 毫克/千克的剂量通过皮下注射重复接种含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体；相同的混合抗体按 16mg/千克的剂量通过皮下注射重复接种另一组 Hyp 小鼠（Hyp/高剂量抗体）；或一组野生型小鼠（WT/载体）通过皮下注射重复接种载体，之后定期（每周一次）测量这些小鼠的胫骨全长的结果。这些结果利用平均值 + /- 标准偏差来表示。“***” 表示 $p < 0.01$ ，其为当测量结果与接种载体的 Hyp 组结果相比较时，通过 Student-t 进行显著性测定而得到的。（实施例 35）

图 31C 显示了共分四组的实验，一组 Hyp 小鼠 (Hyp/载体) 通过皮下注射重复接种载体；一组 Hyp 小鼠 (Hyp/低剂量抗体) 按 4 毫克/千克的剂量通过皮下注射重复接种含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混和抗体；相同的混合抗体按 16mg/千克的剂量通过皮下注射重复

5 接种另一组 Hyp 小鼠 (Hyp/高剂量抗体)；或一组野生型小鼠 (WT/载体) 通过皮下注射重复接种载体，之后定期 (每周一次) 测量这些小鼠的体重变化的结果。这些结果用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。
** 和 *** 分别表示 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ ，其为当测量结果与接种载体的 Hyp 组结果相比较时，通过 Student-t 进行显著性测定而得到的。
10 (实施例 35)

图 32 显示了对 Hyp (载体) 皮下重复给药 (一星期一次)，含有 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的抗体混合物，量 4mg/kg 的 Hyp 小鼠 (Hyp/低剂量抗体)；或对 Hyp 小鼠 16mg/kg 的相同的混合物抗体 (Hyp/高剂量抗体)，和对野生型小鼠 (野生型/载体) 的载体后提

15 取股骨并且焚烧 31 天后的干骨重中骨灰重的比例。这些结果利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。* 表示 $p < 0.001$ ，其为当测量结果与施用载体的 Hyp 组结果相比较时，通过 Student-t 进行显著性测定而得到的。

图 33 显示了利用以 2C3B 或 2C5L 抗体作为固定抗体，3C1E 作为检测抗体的 ELISA 系统对纯化的 FGF-23 蛋白进行了定量测定的结果。(实施例 36)

20

图 34 显示了在给药之前和对未处理的正常小鼠的组 (未处理/载体) 施用一种载体，和载体 (FGF-23/PBS)，2C5L 抗体 (FGF-23/2C5L)，或对已经用等渗泵连续施用人重组 FGF-23 的各组施用 2C3B 抗体 (FGF-23/2C3B) 后 24 小时时的血液磷酸的浓度。这些结果利用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。* 表示 $p < 0.001$ ，该结果为每一组在抗体接种前，其测量结果与服用载体的组结果相比较时，通过 Student-t 进行显著性测定而得到的。“#”和 “##” 分别表示 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ ，其为通过 Student-t 对每一组在接种抗体前和接种抗体后第

25 24 小时进行测定的结果。“+”，“++”和 “+++” 分别表示 $p < 0.05$ ， $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ ，其为当接种抗体的每一组与接种 FGF-

30

23/PBS 24 小时后的组相比较时, 通过 Student-t 进行显著性测定而得到的。(实施例 38)。

序列表内容

SEQ ID NOs: 2-8: 合成 DNA

5 SEQ ID NOs: 9-24: 合成肽

SEQ ID NOs: 25-36: 合成 DNA

完成本发明的最佳模式

参照以下实施例, 本发明将可解释的更加明确, 但本发明并不限于这些实施例所描述的实施方案及技术范畴。

10 实施例 1 重组体 FGF-23 表达型载体的构建

(1) FGF-23H 蛋白表达型载体的制备

编码 FGF-23 的 cDNA 在 96℃ 的条件下保持 1 分钟后, 进行 35 个 PCR 循环, 每一个循环包括 96℃, 30 秒; 55℃, 30 秒; 和 72℃, 30 秒。PCR 反应的模板为肿瘤性骨软化症的肿瘤中的 cDNA 文库, 15 引物为 F1EcoRI (见 SEQ ID NO: 2) 和 LHisNot (见 SEQ ID NO: 3), 酶为 LA-TaqDNA 聚合酶。F1EcoRI 引物对与编码 FGF-23 的 5' 端远上游核苷酸序列进行退火反应, 使得在编码 FGF-23 5' 端的扩增片段上增加一个 *EcoR* I 限制性酶切位点。LHisNot 引物包含一段在编码 FGF-23 的序列的 5' 端终止密码子序列处退火的序列, 和编码一个 20 6 组氨酸标记序列(His-His-His-His-His-His)的一段序列, 还包括终止密码子和一个 *Not* I 限制性酶切序列。因此, 扩增片段编码 FGF-23 蛋白的一段序列, 该序列在 C-末端增加有 6 个组氨酸, 在 6 个组氨酸序列的下游还有一个 *Not* I 限制性酶切位点。该扩增片段用 *EcoR* I 和 *Not* I 消化, 然后连接到 pcDNA3.1 Zeo 载体上(美国, Invitrogen 25 公司), 该载体为一种动物细胞的表达载体, 具有与 *EcoR* I 和 *Not* I 消化方式相类似的消化特征。克隆制备的该表达载体, 测定其核苷酸序列, 以保证其编码的靶 FGF-23 蛋白具有 6 个组氨酸序列。该载体指的是 pcDNA FGF-23H。

F1EcoRI:

30 CCGGAATTCAGCCACTCAGAGCAGGGCACG (见 SEQ ID NO: 2)

LHisNot:

ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGATG
AACTTGGCGAA (见 SEQ ID NO: 3)

(2) FGF-23 蛋白表达载体的构建

- 5 在 94℃ 的条件下保持 1 分钟, 然后进行 25 个 PCR 循环, 每一个循环的条件是利用 pcDNA/FGF-23H 作为模板, 并且利用 F1EcoRI 和 LNoT (见 SEQ ID NO: 4) 作为引物, 和 LA-Taq DNA 聚合酶, 94℃, 30 秒; 55℃, 30 秒; 和 72℃, 1 分钟。经过反应以后, 利用 T4 DNA 聚合酶 (瑞士罗氏公司) 处理 PCR 产物使其具有粘性末端制备一种
- 10 编码 FGF-23 的 cDNA 片段, 和利用多核苷酸激酶 (瑞士罗氏公司) 使 DNA 末端磷酸化。一种 pCAGGS 表达载体 (Niwa H 等, 基因, 1991, 108: 193-199) 利用 *EcoR* I 进行消化, 用 Klenow 片段 (瑞士罗氏公司) 使其末端粘性化, 然后利用牛的小肠碱性磷酸酶 (日本宝酒造公司) 脱磷酸。这样制备的编码 FGF-23 的 cDNA 片段结合到一
- 15 种 pCAGGS 载体上。对如此制备的表达载体进行克隆并且对核苷酸序列进行测定, 这样确保一种编码 FGF-23 蛋白的靶序列能精确的插入到载体中。这里的载体指的是 pCAGGS/FGF-23。

- 上述编码 FGF-23 的片段利用 F1EcoRI 引物和 LNot 引物进行扩增, 然后用 *EcoR* I 和 *Not* I 消化, 最后对其进行纯化。纯化的产物
- 20 通过插入到一种已经通过将分子内的核糖体进入序列(IRES)和增强类型的绿荧光蛋白(EGFP)连接到 pEAK 表达载体 (Edge 生物系统, 美国) 而制备的 pEAK8/IRES/EGFP 载体的 *EcoR* I 和 *Not* I 的限制性酶切位点中得以克隆。对获得的质体核苷酸序列进行测定, 证明该序列编码 FGF-23 蛋白。这个载体指的是 pEAK8/IRES/EGFP/FCG-23。

- 25 LNot: ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGGCGAA(见 SEQ ID NO:4)

- pCAGGS/FGF-23 用 *EcoR* I 消化后, 变得线性化, 然后用 Klenow 片段 (瑞士罗氏公司) 使其具有粘性末端。用 *Bam*H I 进一步消化。一段含有 FGF-23 的 cDNA 的 DNA 片段被分离得到并用琼脂糖电泳
- 30 进行纯化。而且, 一个 INPEP4 表达载体用 *Bgl* II 消化, 用 Klenow 片段 (瑞士罗氏公司) 使其具有粘性末端, 用 *Bam*H I 消化, 然后进

行琼脂糖电泳，纯化载体。含有 FGF-23 cDNA 的片段与载体相连。克隆制备出来的表达载体，测定其核苷酸序列，证实准确插入了编码 FGF-23 的蛋白的靶序列。该载体指的是 INPEP4/FGF-23。

(3) FGF-23RQH 表达载体的构建

- 5 已经发现 FGF-23 蛋白在第 179 位精氨酸和第 180 位丝氨酸之间易于切割。切割位点的 N-末端氨基酸序列是精氨酸（第 176 位）-组氨酸（第 177 位）-苏氨酸（第 178 位）-精氨酸（第 179 位）（见 SEQ ID NO:31），与精氨酸-X-X-精氨酸序列相同，该序列为一种蛋白转化酶的识别序列。而且，已知 ADHR 中的错义突变是第 176 位或第
- 10 179 位的精氨酸残基的替代突变。因此，为了制备一个突变的 FGF-23 蛋白（这里指 FGF-23RQH）作为突变的 FGF-23 在 ADHR 中可进行识别的模型，我们构建了一个载体，该载体通过蛋白转化成的酶而表现出对切割具有抗性，其在 C-末端具有 6 组氨酸标记，和因替代第 176 位和第 179 位的精氨酸残基而具有谷氨酰胺残基。在该制备方法中，
- 15 合成了两条引物，一条是 RQF 正向引物（见 SEQ ID NO:5），另一条是 RQR 反向引物（见 SEQ ID NO:6），它们包含有核苷酸替代序列，并可用谷氨酰胺代替精氨酸。而且，为了扩增 5'端和 3'端突变引入位点的 FGF-23 序列，与这些核苷酸替代引物一起，还制备了另外两条引物：ME1（见 SEQ ID NO: 7）和 HNt（见 SEQ ID NO: 8）。
- 20 ME1 是一个正向引物，含有由 FGF-23 cDNA 编码的起始密码子，并具有 *EcoR* I 限制性酶识别序列。HNt 是一个反向引物，能在由 FGF-23 cDNA 编码的起始密码子前插入一个编码 6 组氨酸标记序列的密码子，并增加一个 *Not* I 限制性酶识别序列。

25 RQF: ATACCACGGCAGCACACCCAGAGCGCCGAG （见 SEQ ID NO:5）

RQR: CTCGGCGCTCTGGGTGTGCTGCCGTGGTAT （见 SEQ ID NO:6）

ME1:ATGAATTCCACCATGTTGGGGGCCCCGCCTCAGG （见 SEQ ID NO:7）

30 HNt:
ATGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGATGGATGAACTTGGCG

AAGGG (见 SEQ ID NO:8)

PCR 反应体系包括: 10ng pGAGGS/FGF-23 作为模板, RQF 和 HNT 的结合引物, ME1 和 RQR 的结合引物 (每个引物 200nM)。反应所用的酶为 pfu DNA 聚合酶 (美国普洛麦格公司)。在 94℃ 的条件下保持 1 分钟, 然后进行 25 个 PCR 循环, 每一个循环包括: 94℃, 30 秒; 55℃, 30 秒; 和 72℃, 1 分钟。得到的两种类型的反应溶液均稀释 10 倍。将反应溶液混合 (每种 1μl), 制成模板。ME1 和 HNT 以终浓度为 200nM 加到模板中, 制备成 50μl 的 PCR 反应溶液。在 94℃ 的条件下保持 1 分钟, 然后进行 25 个 PCR 循环, 每一个循环包括: 94℃, 30 秒; 55℃, 30 秒; 和 72℃, 1 分钟。反应中用的酶为 LA Taq DNA 聚合酶 (日本宝酒造公司)。得到的长约 800bp (碱基对) 的扩增产物用 *EcoR* I 和 *Not* I 消化, 然后纯化, 产物中包含有插入的 DNA 序列。它是通过插入到 pEAK8/IRES/EGFP 载体的 *EcoR* I 和 *Not* I 限制酶位点中得以克隆的, pEAK8/IRES/EGFP 载体通过在 pEAK8 表达载体 (Edge 生物系统公司, 美国) 上连接分子内核糖体进入序列 (IRES) 和加强型绿色荧光蛋白 (RGFP) 而得。测定得到的质体的核苷酸序列, 证实第 176 位和第 179 位的精氨酸残基如期转换成谷氨酰胺残基, 并且编码加于 C-末端含有 6 个组氨酸标记的突变 FGF-23 蛋白。该载体指的是 pEAK8/IRES/EGFP/FGF-23RQH。

20 实施例 2 重组体 FGF-23 蛋白和重组体突变 FGF-23 蛋白的表达

(1) FGF-23H 表达细胞的获得

通过在载体中的抗氨苄青霉素基因内的 *Fsp* I 限制酶位点处切割使大约 20μg 的 pcDNAFGF-23H 线性化, 然后被纯化。纯化的产物溶于 10μl 纯水中, 与 1×10^7 CHO Ras 克隆-1 细胞 (Shirahata S. 等, 生物科学、技术与生物化学, 59: 345-347, 1995) 混合, 利用 Gene Pulser II (Bio Rad, 美国) 通过电穿孔法将该基因引入到细胞中。这些培育细胞在含有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 MEMα 培育溶液 (Gibco BRL, 美国) 中培育 24 小时后, Zeocin (美国英杰生命技术公司) 以终浓度为 0.5mg/ml 加到溶液中, 混合溶液, 培育 1 周。粘着的和生长的细胞用胰蛋白酶培育, 然后在 Zeocin 最终浓度为 0.3mg/ml 时用限制稀释法对其进行克隆, 由此得到了 35 种类型的克隆细胞。所有细胞中表

达 FGF-23H 蛋白的细胞通过下面的 Western 印迹法以最高水平得以鉴定。收集每一种克隆细胞的培养物上清液，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。然后得到的蛋白转移至一种聚偏氟乙烯膜（美国 Millipore 公司）上，利用抗组氨酸标记（C-末端）的抗体（美国英杰生命技术公司）和 ECL 发光系统（美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司）对 FGF-23H 蛋白上的信号分子序列（约 32KDa）进行检测。检测的结果，表达量最高的#20 克隆命名为 CHO-OST311，然后利用与 2000 年 8 月 11 日（编号为 FERM BP-7273）的申请相同的方法保存在日本现代产业科学技术国家研究所的国际专利生物体保藏中心（Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本）。这里的 CHO-OST311 指的就是 CHO-FGF23H。

(2) 表达 FGF-23 和表达 FGF-23RQH 的细胞的获得

利用膜融合脂，通过基因转移方法将 pEAK8/IRES/EGFP/FGF-23 和 pEAK8/IRES/EGFP/FGF-23RQH 载体转入到 CHO Ras 克隆-1 细胞中。CHO Ras 克隆-1 细胞培育至细胞覆盖 6 孔板的底面约 60%的程度。然后，将培育溶液转移，加入 1ml 不含血清的 MEM α 培育液。2.5 μ g 的载体和 10 μ l 的 Transfectam（商标）（美国普洛麦格公司）各自与 50 μ l 的不含血清的 MEM α 培育液相混合。然后这两种混合溶液再混合，培育 10 分钟，混合，然后再加到原来的 6 孔板中。培育 2 小时之后，含有 DNA 的培育溶液被转移，由含有 10%FCS 的培养液代替，然后培养液培育过夜。次日，加入最终浓度为 5 μ g/ml 的嘌呤霉素（美国 Sigma 公司），以选择抗药性细胞。以这种方式获得的抗药性细胞通过类似于上述获得 FGF-23H 表达细胞的限制稀释法进行克隆。而且，通过 Western 印迹法选择最高水平表达靶蛋白的细胞线。这些细胞分别指 CHO-FGF23 和 CHO-FGF23RQ。

(3) 重组蛋白的纯化

当利用抗 6 组氨酸标记序列的抗体通过 Western 印迹法从 CHO-FGF23H 的培养物上清液中检测出重组体时，一条约 32kDa 的带和一条约 10kDa 的带被识别，见图 1A。当把两条带从凝胶中切下来，测定 N-末端的氨基酸序列时，从大分子量的带中检测出一个起始于 SEQ ID NO:1 中的第 25 位氨基酸残基的一段氨基酸序列，表明信号分子

序列在从 FGF-23 蛋白分泌的过程中被除去。另一方面, 已确定小分子量的带含有的一段氨基酸序列始于 SEQ ID NO:1 中的第 180 位氨基酸残基, 表明该片段是从第 179 位和第 180 位切割处产生的。通过利用识别 FGF-23 的 N-末端的多克隆抗体进行检测, 证明存在一段至第 179 位的序列。

1000ml CHO-FGF23H 细胞的培养物上清液在 4℃, 16,200g 离心 15 分钟, 以除去悬浮的细胞。然后上清液通过一个充满 SP-琼脂糖凝胶 FF (商标) (美国 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司) 的柱子(内径为 30mm × 200mm 长), 以使相应于 SEQ ID NO:1 中的第 180 位至第 251 位氨基酸残基的肽和具有 6 组氨酸标记序列的肽通过柱子而不被吸收, 而相应于 SEQ ID NO:1 (从这里开始, 该段可能也指全长 FGF-23 蛋白) 中的具有 6 组氨酸标记序列的第 25 位至第 251 位氨基酸残基的肽被吸附在柱子上。当柱子上吸附的物质用氯化钠浓度梯度溶液(用 50mM 的磷酸钠缓冲液配制成从 0 至 0.7M 的氯化钠溶液, pH 6.7)洗脱时, 发现用约 0.3M 的氯化钠溶液可将一部分含有 6 组氨酸标记的全长 FGF-23 蛋白洗脱掉, 从 SEQ ID NO:1 的第 179 位氨基酸残基至 N-末端的序列可用约 0.4M 的氯化钠溶液洗脱掉。用 SP-琼脂糖凝胶柱以这种方式分离得到的片段可进一步将它们通过 Talon Superflow (商标) (Clontech 公司, 美国) 金属亲和柱进行分离。由于从第 179 位氨基酸残基至 N-末端范围的序列也与金属柱有亲和性, 这对于提高纯化效果是有效的。为了全长 FGF-23 蛋白通过 CBB 染色可得到单一条带, 利用 SP-琼脂糖凝胶柱进一步纯化。结果见图 1B。

FGF-23 蛋白也可用一种相似的方法进行纯化。CHO-FGF23 的培养物上清液通过一个孔径为 0.2μm 的 SuperCap (商标) (Pall Gelman 实验室, 美国) 膜过滤, 然后过滤后的溶液加到 SP-琼脂糖凝胶 FF (美国 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司)。和柱子亲和力弱的物质用 50mM 的磷酸钠缓冲液(pH 6.7)洗涤下来。当滞留在柱子中的蛋白用 0 至 0.7M 的氯化钠浓度梯度溶液洗脱时, 发现全长 FGF-23 蛋白被洗脱进了 0.3M NaCl 的组分中。蛋白被吸附于 Talon Superflow (商标) (克隆技术公司(Clontech), 美国) 金属亲和柱上, 用 50mM

的磷酸钠缓冲液(pH 6.7)洗脱, 然后向柱内加入各种浓度的咪唑, 洗脱和纯化蛋白。而且, 进一步将含有靶蛋白的级分吸附于一种 SP-琼脂糖凝胶 FF 柱上进行洗脱, 然后纯化。利用类似方法, 全长 FGF-23RQ 蛋白从 CHO-FGF23RQ 的上清液中纯化出来。

- 5 实施例 3 产生抗人类 FGF-23 的小鼠单克隆抗体的杂交瘤的获得
根据“单克隆抗体实验方案的介绍”等中叙述的一般方法, 在本实施例中制备了单克隆抗体 (Tamie Ando, 等, Tan-kurokh Koutai Jikken Sosa Nyumon, KODANSHA, 1991)。用于免疫的动物是 Balb/c 小鼠。人类 FGF-23 免疫是根据免疫原的差异, 在 2 个类型的方法后
10 进行的。

(1) 利用载体的给药和重组蛋白的给药的结合来免疫

- 初始时对 Balb/c 小鼠进行免疫是通过引入实施例 1 中制备的 INPEP4/FGF-23 载体 (10 或 50 μ g/小鼠) 利用 Trans IT (商标) 体内基因多样性系统试剂 (日本宝酒造公司) 进行静脉注射。助促进免
15 疫反应是通过初始免疫后每周一次引进相同载体来进行的。将实施例 2 中制备的 FGF-23RQH 蛋白 (20-30 μ g/小鼠) 悬浮于含有三十碳六烯, 吐温 80 (聚山梨醇酯 80), 单磷脂 A 和海藻糖霉菌酸酯的 RIBI 佐剂 (Corixa, 美国) 中。加强免疫是通过腹膜注射乳液 4 或 5 次来进行的。随后, 在得到下面描述的脾细胞之前第 4 天时, 小鼠用尾静
20 脉注射实施例 2 中制备的 FGF-23H 蛋白 (18 μ g/小鼠) 的方法进行免疫。

(2) 用人类 FGF-23 进行免疫

- 初始免疫利用 Balb/c 小鼠通过腹膜注射一种悬浮液, 该悬浮液是通过在上述 RIBI 佐剂中悬浮实施例 2 中制备的 FGF-23 (22 μ g/小鼠)
25 而制得的。加强免疫是通过腹膜注射同一种蛋白, 每周一次, 持续 4 周以上。在得到下面描述的脾细胞之前第 3 天时, 通过尾静脉给小鼠注射实施例 2 中制备的 FGF-23H 蛋白 (10 μ g/鼠) 的方法进行免疫。

(3) 杂交瘤的制备和选择

- 切除小鼠的脾脏, 按照上述方法进行免疫。从脾脏中采集到的脾
30 细胞与小鼠的骨髓瘤 SP2/0(ATCC: CRL 1581)以 5:1 的比例混合, 然后细胞用聚氧乙烯 1500 (日本罗氏诊断产品有限公司) 作为一种融

合剂进行融合，制备杂交瘤。杂交瘤通过在含有 HAT，含有 10% 胎牛血清(FCS)，次黄嘌呤(H)，氨基喋呤(A)和胞嘧啶(T)的 DMEM 培养基 (Gibco BRL, 美国)上培育细胞而进行选择。克隆是利用含有 HT 的 DMEM (达尔伯克氏必需基本培养基)培养基通过限制稀释法而进行。因此，最终获得从单个细胞衍生而来的克隆杂交瘤。

(4) 产生抗 FGF-23 抗体的克隆杂交瘤的选择

产生专一性识别 FGF-23 蛋白抗体的杂交瘤通过检测由杂交瘤产生的抗体和 FGF-23 蛋白的结合来选择。根据第一种免疫方法获得的杂交瘤以下面的方法来进行选择。向用于 ELISA (Maxisorp(商标), Nunc, 美国)实验的一个 96 孔微量培养板中加入 50 μ l 在 50mM 碳酸氢钠溶液中稀释至 1 μ g/ml 的 FGF-23H 蛋白溶液。在 37 $^{\circ}$ C 培育 30 分钟或 4 $^{\circ}$ C 培育 10 小时，使得 FGF-23H 蛋白吸附在微量培养板上。接下来，除去该溶液，一种阻滞剂(SuperBlock(商标)Blocking Buffer, PIERCE, 美国)加到每个孔中，然后在室温培育 30 分钟。每个孔用含有 0.1%吐温 20(包含 500mM 氯化钠的 TRIZMA 预置晶体(商标), 美国 Sigma 公司) (T-TBS, 为三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水)的 Tris (三羟甲基氨基甲烷缓冲液)缓冲盐溶液洗涤两次。取每种类型的杂交瘤培养物上清液 50 μ l 加入到已被上述的 FGF-23H 蛋白包被的微量培养板的每个孔中。反应 30 分钟后，每个孔用 T-TBS (Tris 缓冲盐溶液)洗涤两次。接下来，向每个孔中加入 50 μ l 稀释 3000 倍的过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (Zymed 实验室, 美国)，在室温培育 30 分钟。利用 T-TBS (三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水, 下同)洗涤每个孔 3 次后，向孔中加入 50 μ l 含有 N-四甲联苯胺 (丹麦, DAKO) 的底物缓冲液，在室温培育 15 分钟。随后，向每个孔中加入 50 μ l 0.5M 的硫酸，以停止反应。450nm 波长下的吸收值通过一个微量培养板阅读器 (MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本)参照 570nm 波长的吸收值进行测定。选择吸收值明显增加的杂交瘤，利用 FGF-23 蛋白做相同实验，再次确保选择的是与 FGF-23 结合的克隆。因此，得到了 9 种类型的作为产生识别 FGF-23 蛋白的抗体的杂交瘤克隆。

在这些克隆中，包括下述的 1C3H, 1D6A, 2A2B, 2C3B 和 2C5L。通过二次免疫方法获得的杂交瘤按照下列步骤进行选择。向用于

- ELISA (Maxisorp (商标), Nunc, 美国) 实验的 96 孔微量培养板的每个孔中加入 50 μ l 在 50mM 的碳酸氢钠溶液中稀释至 1 μ g/ml 的 FGF-23 蛋白溶液。在 4 $^{\circ}$ C 培育 10 小时, 以使 FGF-23 蛋白吸附在微量培养板上。随后, 除去溶液, 一种阻滞剂 (SuperBlock (商标) Blocking Buffer, PIERCE, 美国) 加到每个孔中, 然后在室温培育 30 分钟。每个孔用含有 0.1% 吐温 20 的 Tris 缓冲溶液 (T-TBS) 洗涤两次。取每种类型的杂交瘤的培养物上清液 50 μ l 加入到已被上述的 FGF-23H 蛋白包被的微量培养板的每个孔中。反应 30 分钟后, 每个孔用含有 0.1% 吐温 20 的 T-TBS (Tris 缓冲盐溶液) 洗涤两次。接下来, 向每个孔
- 10 中加入 50 μ l 稀释 3000 倍的过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (Zymed 实验室, 美国), 在室温培育 30 分钟。每个孔用 T-TBS 溶液洗涤 3 次, 向每个孔中加入 50 μ l 含有四基甲联苯胺 (丹麦, DAKO) 的底物缓冲液, 在室温培育 15 分钟。随后, 向每个孔中加入 50 μ l 的 0.5M 的硫酸, 以停止反应。450nm 波长下的吸收值通过一个微量培养板阅
- 15 读者 (MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本) 参照 570nm 波长的吸收值进行测定。选择吸收值明显增加的杂交瘤。因此, 得到了 9 种类型的作为产生识别 FGF-23 蛋白的抗体的杂交瘤克隆。在这些克隆中, 包括 3C1E。

- 这样得到的专一性识别 FGF-23 蛋白的抗体的亚类利用一种 Iso
- 20 Strip 小鼠单克隆抗体 isotyping 试剂盒 (Roche 公司, 美国) 进行鉴定。结果如表 1 所示。

表 1
抗人类 FGF-23 的抗体

杂交瘤克隆	亚类	ELISA 450nm-570nm
1C3H	IgG1(κ)	3.39
1D6A	IgG1(κ)	3.21
2A2B	IgG1(κ)	2.67
2C3B	IgG1(κ)	1.21
3C1E	IgG1(κ)	3.5 或更多
2C5L	IgG1(κ)	1.38

在上述的杂交瘤克隆中,有3个杂交瘤克隆(2C3B, 3C1E, 和 1D6A)利用与 2001 年 12 月 26 日的申请相同的方法被国际性的保存在布达佩斯协议认可的日本现代产业科学技术国家研究院的国际生物体储藏处 (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本)。而且, 2C5L 杂交瘤克隆利用与 2003 年 1 月 6 日的申请相同的方法被国际性地保存在布达佩斯条约认可的日本现代科学技术研究所的国际专利生物体保藏处 (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本)。这些克隆的保藏号如下所示:

10 2C3B: FERM BP-7838

 3C1E: FERM BP-7839

 1D6A: FERM BP-7840

 2C5L: FERM BP-8268

实施例 4 单克隆抗体的制备

15 (1) 包含有抗 FGF-23 抗体的培养物上清液的制备

产生抗 FGF-23 抗体的杂交瘤在 eRDF 培养基 (KYOKUTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIAL CO., LTD. 日本) 中进行驯化, 培养基包含有 10 μ g/ml 的牛胰岛素 (美国 Sigma 公司), 5.5 μ g/ml 的人转铁蛋白 (美国 Sigma 公司), 0.01 mM 的乙醇胺溶液 (美国 Sigma 公司), 和 5ng/ml 的亚硒酸钠溶液 (美国 Sigma 公司)。用于制备抗体的杂交瘤在旋转式烧瓶中进行培养。培养后的溶液利用孔径为 0.2 μ m 的滤纸 (Pall Gelman 实验室, 美国) 进行过滤以除去如杂交瘤这样的废物, 然后收集包含抗体的培养物上清液。

(2) 利用 G 蛋白纯化单克隆抗体

25 包含有抗 FGF-23 抗体的培养物上清液通过一种 G 蛋白琼脂糖亲和柱 (美国 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司) 进行分离, 这样抗体被吸附在了亲和柱上。然后利用一种 0.1M 的甘氨酸缓冲液 (pH 值为 2.8) 进行淋洗。1M 的 Tris-HCL 溶液加入进洗脱部分的溶液中以调节 pH 值为 7.2。对这样制备的抗体溶液利用一种透析膜 (Spectrum 实验室, 美国) 用 PBS(-) 进行透析和取代, 该透析膜的最大分子量为 10000, 并且利用一种孔径为 0.22 μ m 的滤纸膜 (美国 Millipore 公司)

进行过滤灭菌，这样得到纯化后的抗 FGF-23 抗体。通过在 280nm 波长处的吸收值来计算纯化抗体的浓度，然后通过利用 1mg/ml 作为 1.35OD 的标准进行计算。

(3) 利用 A 蛋白纯化单克隆抗体

- 5 抗体利用一种 A 蛋白载体亲和柱 (IBL Co., Ltd., 日本)，一种甘氨酸缓冲溶液 (pH 值为 8.9) 作为吸附缓冲溶液，一种柠檬酸缓冲液 (pH 值为 4.0) 作为洗脱缓冲溶液来亲和性纯化包含有抗 FGF-23 抗体的培养物上清液。1M 的 Tris-HCL 溶液加入进包含有该抗体的洗脱部分溶液中以调节 pH 值为 7.2。然后，对包含有抗体的溶液利用
- 10 PBS(-)溶液通过一种透析膜和一种孔径为 0.22 μ m，已灭菌的滤纸膜进行透析和取代。通过在 280nm 波长处的吸收值来计算纯化抗体的浓度，然后通过利用 1mg/ml 作为 1.35OD 的标准进行计算。

这样获得的每一种纯化后的单克隆抗体利用产生这种抗体的杂交瘤的名称来命名。例如，由 1D6A 杂交瘤产生的抗体命名为 1D6A 抗体。

15

实施例 5 抗 FGF-23 部分肽的多克隆抗体的制备

(1) 对应 FGF-23 部分序列的肽的合成

- SEQ ID NO:1 多肽的疏水性程度通过利用版本为 6.5.1 的 MacVector 计算函数来预测，然后对制备的肽抗体的合适的位点进行预测。在去除了具有高度亲水性，并经过糖链改性或磷酸化位点之后，适于制备抗体的部分序列被提取出来。因此，一种从 SEQ ID NO:1 的第 25 位酪氨酸 (残基号为: 25) 开始的包含有 15 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-25 的肽 (SEQ ID NO:9);
- 20 一种从第 48 位精氨酸开始的包含有 20 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-48 的肽 (SEQ ID NO:10); 一种从第 114 位精氨酸开始的包含有 15 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-114 的肽 (SEQ ID NO:11); 一种从第 148 位甘氨酸开始的包含有 16 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-148 的肽 (SEQ ID NO:12); 一种从第 170 位天门冬酰胺开始的包含有 20 个氨基酸残基和 N-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-170 肽 (SEQ ID NO:13); 一种从第 174 位脯氨酸开始的包含
- 25
- 30

有 14 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-174 肽(SEQ ID NO:14); 一种从第 180 位丝氨酸开始的包含有 15 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-180 肽(SEQ ID NO:15); 一种从第 210 位亮氨酸开始的包含有 13 个氨基酸残基和 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-210 肽(SEQ ID NO:16); 一种从第 237 位甘氨酸开始的包含有 15 个氨基酸残基的 hFGF23-237 肽(SEQ ID NO:17)被选择作为抗原, 并且通过化学方法进行了合成。

hFGF23 - 25: YPNASPLLGSWSWGLC (SEQ ID NO: 9)

hFGF23 - 48: RNSYHLQIHKNGHVVDGAPHQC (SEQ ID NO: 10)

hFGF23 - 114: RFQHQTLENGYDVYHSPQYHC (SEQ ID NO: 11)

hFGF23 - 148: GMNPPPYSQLSRNEC (SEQ ID NO: 12)

hFGF23 - 170: CNTPIPRRHTR (SEQ ID NO: 13)

hFGF23 - 174: PRRHTRSAEDDSERC (SEQ ID NO: 14)

hFGF23 - 180: SAEDDSERDPLNVLC (SEQ ID NO: 15)

hFGF23 - 210: LPSAEDNSPMASDC (SEQ ID NO: 16)

hFGF23 - 237: GGTGPEGCRPFAKFI (SEQ ID NO: 17)

(2)抗 FGF-23 部分肽的多克隆抗体的制备

所有上述制备的肽通过它们自己的半胱氨酸残基结合到牛的甲状腺球蛋白上(载体蛋白), 然后用于免疫接种。对于免疫接种, 每一种抗原肽用 3 只兔子。第一次接种利用结合到载体蛋白(利用弗罗德氏完全佐剂作为载体蛋白)上的肽作为乳液(100 μ g/兔子), 然后将该乳液通过真皮或皮下接种的方式给兔子进行接种。第一次接种 1 周以后, 利用结合到载体蛋白(利用弗罗德氏不完全佐剂作为载体蛋白)上的肽作为乳液, 以 100 μ g/兔子的剂量进行类似的给药。以 2 周的间隔进行同样的给药 6 次, 最后一次给药完成后 1 周, 对兔子进行放血, 采集抗血清。

为了制备用于从兔子的血清中纯化抗部分肽抗体的一种亲和性层析柱, 用于免疫的每一种肽利用 SulfoLink 试剂盒(PIERCE, 美国)固定在了凝胶上。抗血清加入进利用 PBS(-)溶液作为吸附缓冲溶液的亲和柱中, 这样可在亲和柱中滞留结合到用于免疫接种的肽上的抗

体。接下来,利用 0.1M 的甘氨酸缓冲溶液 (pH 值为 2.5 至 3.3) 作为洗脱缓冲溶液对结合到亲和柱上的抗体进行洗脱,然后收集洗脱部分溶液。1M 的 Tris-HCL 溶液加入进洗脱溶液中以调节 pH 值为 7.2 左右。将这样制备的抗体溶液加入到一种 NAP25 凝胶过滤亲和柱 (美国 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司) 中,这样缓冲溶液就被 PBS(-)取代了。利用一种孔径为 0.22 μ m, 型号为 MILLEX-GV 的滤纸膜 (美国 Millipore 公司) 进行消毒过滤,这样可得到抗每一种肽的抗体。通过在 280nm 波长处的吸收峰来计算纯化抗体的浓度,然后通过用 1mg/ml 作为 1.35OD 的标准进行计算。这样获得的每一种纯化后的抗体用一种用于免疫接种的肽的名称来命名。例如,一种通过 SEQ ID NO:9 的 hFGF23-25 肽进行免疫接种所得到的抗体命名为一种 h FGF23-25 抗体。

(3) 利用抗 FGF-23 部分肽抗体识别 FGF-23 蛋白和其代谢产物

利用 Western 印迹法 (该印迹法利用由上述方法得到的 h FGF23-48 和 hFGF23-148 抗体) 对 CHO-FGF23H-表达细胞培养物上清液中的 FGF-23H 蛋白和其代谢产物进行了分析。如图 1 所示,利用这两种抗体对大约为 32kDa 的全长 FGF-23H 蛋白进行了测定。而且,观察到了一种大小约为 18 或小于 18kDa 的代谢产物,并且它们被认为是由 FGF-23 蛋白 (该蛋白介于如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的第 179 位和第 180 位之间的氨基酸残基) 的切割所导致的 N-末端片段衍生出来的。h FGF23-48 抗体可识别小片段的代谢产物。CHO-FGF23RQ 培养物上清液中的 FGF-23RQ 蛋白和其代谢物,由于产生了变异蛋白从而避免了介于第 179 位和第 180 位之间的氨基酸残基的切割,利用 hFGF23-148 对 FGF-23RQ 蛋白和其代谢物进行了检测。如图 1C 所示,在 FGF-23H 例子中已被识别的片段的肽未被检测出来。基于上述结果,通常认为在 FGF-23 蛋白切割的代谢中,介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割产生的 N-末端片段进一步断裂成小片段,但是这样的小片段是经过介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割之后产生的。因此,当考虑 FGF-23 蛋白的代谢作用时,检测介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割与否非常重要。

实施例 6 生物素化抗体的制备

利用上述 9 种类型经纯化后的抗 FGF-23 部分肽的多克隆抗体和 13 种类型的抗 FGF-23 的单克隆抗体进行生物素化(biotinylated)。将 Biotin-AC5-Osu (DOJINDO 实验室, 日本)溶解到 N,N-二甲基甲酰胺中, 得到浓度为 1.82mg/ml 的溶液, 取 10 μ l 加入到一种抗体溶液 (该抗体溶液已经利用一种浓度为 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释到了 1mg/ml) 中, 然后将生成物在 4 $^{\circ}$ C 通过上下摇荡的方式混合 2 小时。接下来, 将反应溶液加入到一种 NAP10 亲和柱 (美国 Amersham Pharmcia 生物技术有限公司) 中, 除去未反应的 Biotin-AC5-Osu, 并且溶剂被 PBS(-)取代了。这样, 获得了 9 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 部分肽的多克隆抗体和 5 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 的单克隆抗体 (1C3H 抗体, 1D6A 抗体, 2A2B 抗体, 2C3B 抗体, 和 3C1E 抗体)。

实施例 7 利用识别 FGF-23 专一性位点的多克隆抗体的夹心式 ELISA 法

(1) 夹心式 ELISA 系统的构建

从上述 9 种类型的抗 FGF-23 部分肽序列的多克隆抗体中通过结合其中 8 种类型的抗体 (hFGF23-25 抗体, hFGF23-48 抗体, hFGF23-114 抗体, hFGF23-148 抗体, hFGF23-170 抗体, hFGF23-180 抗体, hFGF23-210 抗体, 和 hFGF23-237 抗体) 作为固定化抗体和检测抗体对一种夹心式 ELISA 系统的构建进行了检测。

为了固定抗体, 用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释 8 种类型的抗 FGF-23 部分肽的多克隆抗体 (hFGF23-25 抗体, hFGF23-48 抗体, hFGF23-114 抗体, hFGF23-148 抗体, hFGF23-170 抗体, hFGF23-180 抗体, hFGF23-210 抗体, 和 hFGF23-237 抗体) 至 30 μ g/ml。向进行 ELISA 系统(Maxisorp(商标), Nunc, 美国)实验的 96 孔板的每一个孔中加入 50 μ l 的这种溶液, 然后将该溶液在 37 $^{\circ}$ C 培育 1.5 小时。接下来, 除去反应溶液, 向每孔中加入 50 μ l 的 Superblock(商标)(PIERCE, 美国), 室温培育 60 分钟, 以阻滞反应的进行。在溶液除掉以后, 向每一个孔中加入 50 μ l 浓度为 1 μ g/ml 的 FGF-23H 蛋白溶液, 并且在室温培育 1 小时, 以将该蛋白结合到固定化的抗体上。经过抗体反

应, 利用 T-TBS 溶液洗涤孔 3 次。利用含量为 10%Blockace (日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释上述 8 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 部分肽的抗体 (hFGF23-25 抗体, hFGF23-48 抗体, hFGF23-114 抗体, hFGF23-148 抗体, hFGF23-170 抗体, hFGF23-180 抗体, hFGF23-210 抗体, 和 hFGF23-237 抗体) 到 10 μ g/ml。这些抗体和作为对照的一种含量为 10%Blockace 的 T-TBS 溶液以 50 μ l/孔的量加入到每一个孔中。每一种溶液在室温培育 30min, 以进行次级反应。利用 T-TBS 溶液将每一孔洗涤 3 次后, 利用含 Blockace 量为 10%的 T-TBS 溶液稀释标记的抗生物素蛋白链菌素(DAKO, 丹麦)溶液到 5000 倍, 取 50 μ l 稀释后的溶液加入到每一个孔中。用 T-TBS 溶液洗涤每一孔 4 次, 将 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (是一种过氧化物生色底物) 加入到每孔中, 室温作用 15 分钟, 以使其发生颜色反应。50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液加入到每孔中以停止反应。利用 MTP-300 (用于吸收峰测定的系统) 对该 96 孔板 (CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本) 进行测定, 测量值为 450nm 处的光吸收值减去 570nm 处的光吸收值(见表 2)。对于未加生物素标记的抗体的对照组, 从 450nm-570nm 范围内获得的所有测定值都是 0.06 或低于 0.06。然而, 如表 2 所示, 由于固定化抗体和检测用抗体的多重结合, 致使 450nm-570nm 的光吸收值明显升高。如图 1 所示, 由于通过 FGF-23 蛋白的切割产生多肽的事实在目前来说是已知的, 那么在同一样品中就可能产生由 FGF-23 衍生得到的不同分子类型的多肽。基于这里的抗体可识别 FGF-23 的特异性位点这一事实, 根据抗体的重组体可缩减所要测定的分子类型。比如, 当使用一种重组体时, hFGF23-170 抗体被固定化, hFGF23-25 抗体作为检测抗体, 因为两种抗体的抗原位点均包含在如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的介于第 25 位和第 179 位残基之间的 N-末端部分多肽片断, 那么就不仅能预测 SEQ ID NO:1 所示的介于第 25 位和第 251 位残基之间的多肽的全长, 而且能利用这种重组体通过夹心式 ELISA 对 N-末端部分多肽片段进行测定。另一方面, 当 hFGF23-180 抗体被固定化, 并且利用 hFGF23-237 抗体进行测定时, 不仅能预测 N-末端部分多肽片断, 而且能测定一种相当于如 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白中的第 180 位至第 251 位残基

- 之间的 C-末端部分多肽片段。而且, 举例来说, 当 hFGF23-237 抗体被固定化, hFGF23-25 抗体作为检测抗体时, 据估计只有全长 FGF-23 蛋白可被检测出 (未能检测出切割后产生的 N-末端和 C-末端部分多肽)。因此, 利用这些重组体的复合物能够对分析物 (如生物样品)
- 5 中的 FGF-23 全长多肽和部分多肽进行绝对量的测定, 也使得我们能够区分这些多肽的存在比例。

表 2
利用抗 FGF-23 的多克隆抗体结合夹心式 ELISA 系统测定 FGF-23 蛋白 (450nm-570nm 的光吸收值)

固定化抗体									
	hFGF23-25	hFGF23-48	hFGF23-114	hFGF23-148	hFGF23-170	hFGF23-180	hFGF23-210	hFGF23-237	无
生物素化的抗体									
hFGF23-25	0.517	0.046	0.040	0.050	1.543	1.938	0.686	1.808	0.048
hFGF23-48	0.037	0.050	0.028	0.028	0.030	0.033	0.031	0.034	0.037
hFGF23-114	0.033	0.026	0.029	0.026	0.027	0.029	0.026	0.029	0.036
hFGF23-148	0.091	0.070	0.046	0.140	0.157	0.102	0.083	0.104	0.047
hFGF23-170	0.444	0.035	0.033	0.068	0.112	0.054	0.041	0.057	0.042
hFGF23-180	0.370	0.036	0.034	0.042	0.045	0.193	0.286	0.652	0.038
hFGF23-210	0.309	0.034	0.033	0.036	0.043	0.563	0.065	0.383	0.035
hFGF23-237	1.096	0.061	0.047	0.081	0.113	2.143	0.407	0.442	0.057

固定化抗体的种类列在了表 2 中顶部的水平线之上, 检测抗体的种类如表 2 中的最左一列所示。表中的数字是利用每一种重组体测定得到的。

(2) 利用夹心式 ELISA 法定量测定 FGF-23 蛋白

- 5 根据以上描述的制备夹心式 ELISA 系统的方法, 利用 hFGF23-25 抗体做固定化抗体, hFGF23-237 抗体做检测抗体对测定物质, 浓度分别为 1, 0.33, 0.1, 0.033, 0.01, 0.0033, 和 0.001 μ g/ml 的 FGF-23H 蛋白溶液进行了测定。测定结果如 Figure2 所示。在 0.1-1 μ g/ml 的浓度范围之内, 观察到了由 450nm-570nm 处测定所得值的浓度依赖性
- 10 增加, 表明了至少在该浓度范围内, FGF-23H 蛋白能以一种浓度依赖型的方式进行测定。

实施例 8 FGF-23 部分肽的制备

除了如实施例 5 中所制备的对应 FGF-23 部分序列的肽以外, 还通过化学方法合成了具有下述 FGF23 的部分序列的肽:

- 15 一种从 SEQ ID NO: 1 的残基号 38 (甘氨酸) 开始的 13 个氨基酸残基和具有在肽的 C 末端加入半胱氨酸残基的 hFGF23-38 肽(SEQ ID NO:18); 一种从 SEQ ID NO:1 中的残基号为 68 (苏氨酸) 开始的包含有 28 个氨基酸残基的 hFGF23-68 肽(SEQ ID NO:19); 一种从 SEQ ID NO:1 中的残基号为 96 (甲硫氨酸) 开始的包含有 18 个氨基酸残基的 hFGF23-96 肽(SEQ ID NO:20); 一种从 SEQ ID NO:1 中的残基号为 129 (丝氨酸) 开始的包含有 22 个氨基酸残基和肽的 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-129 肽(SEQ ID NO:21); 一种从 SEQ ID NO:1 中的残基号为 161 (精氨酸) 开始的包含有 13 个氨基酸残基和肽的 C-末端上加有一个半胱氨酸残基的 hFGF23-161 肽(SEQ ID
- 20 NO:22); 一种从 SEQ ID NO:1 中的残基号为 197 (丙氨酸) 开始的包含有 16 个氨基酸残基的 hFGF23-197 肽(SEQ ID NO:23); 和一种从 SEQ ID NO:1 中的残基号为 220 (丝氨酸) 开始的包含有 24 个氨基酸残基的 hFGF23-220 肽(SEQ ID NO:24)。

hFGF23-38: GLIHLYTATARNSC (SEQ ID NO: 18)

- 30 hFGF23-96: TIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLC (SEQ ID NO: 19)

hFGF23-96: MDFRGNIFGSHYFDPENC (SEQ ID NO: 20)

hFGF23-96: SPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNC (SEQ ID NO: 21)

hFGF23-96: RNEIPLIHFNTPIC (SEQ ID NO: 22)

5 hFGF23-96: ARMTPAPASCSQELPS (SEQ ID NO: 23)

hFGF23-96: SDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGC (SEQ ID NO: 24)

实施例 9 对单克隆抗体中 FGF-23 识别区域的检测

通过检测含有人类 FGF-23 的部分序列的肽的反应活性对包含能
10 够被抗 FGF-23 单克隆抗体所识别的氨基酸序列的区域进行测定。

(1) 实验 1: 与固定的肽相结合

利用 50mM 的碳酸氢钠溶液将实施例 5 中合成的肽(SEQ ID NOS: 7-17)稀释到浓度为 1 μ g/ml 的溶液。50 μ l 的这种溶液加入到 ELISA 系统 (Maxisorp(商标), Nunc, 美国) 中的 96 孔板中, 然后将该溶液
15 在 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时, 以固定 FGF-23 部分肽。接下来, 除去反应溶液, 向每孔中加入 50 μ l 的一种阻滞溶液 (Superblock(商标), PIERCE, 美国), 然后室温培育 60 分钟, 以阻滞反应的进行。在溶液除掉以后, 向每一个孔中加入 50 μ l 实施例 3 制备的杂交瘤的培养物上清液或一种作为对照的包含有 DMEM 介质的 HT 溶液, 然后将该溶液在室温
20 培育 1 小时以结合 FGF-23 部分肽。在抗体结合反应的后, 利用 T-TBS 溶液洗涤孔 3 次。利用一种含 10% 封闭溶液 (Blockace(商标), (日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(H+L)-F(ab')₂ 片段至 3000 倍, 取 50 μ l 稀释后的溶液加入进每一孔中, 然后将该溶液在室温培育 30 分钟以结合次级抗体。利用 T-TBS 溶液洗
25 涤每个孔 3 次, 将 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (是一种过氧化物生色底物, 丹麦, DAKO) 加入到每孔中, 室温作用 3 分钟, 以使其发生颜色反应。下一步, 50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液加入到每孔中以停止反应。利用一种吸收峰测定系统(MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本) 对该 96 孔板进行测定, 获得的测定值为 450nm 处的光吸收值
30 减去 570nm 处的光吸收值。对于对照组 (仅加有包含 DMEM 基质的 HT 溶液), 从 450nm-570nm 范围内获得的所有测定值都是 0.06 或

低于 0.06。然而，在该实例中（已经加入了杂交瘤培养物的上清液和固定了专一性的肽），观察到了光吸收值的明显增加。这些结果如表 3 所示。2A2B 抗体结合在了 SEQ ID NO: 12 的一种 hFGF23-96 肽上。1D6A 表明可与 SEQ ID NO:17 的 hFGF23-148 肽相结合。因此，可得出如下结论：2A2B 杂交瘤产生的抗体与 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 中的介于第 148 位和第 163 位氨基酸残基之间的区域或部分区域相结合。而且，1C3H 结合在了 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 中的介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的区域或部分区域，1D6A 结合在了 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 中的介于第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的区域或部分区域。

表 3
具有 FGF-23 部分序列的固定化肽与由产生单克隆抗体的杂交瘤培养物上清液中的抗体的反应活性

	固定化抗体							
	hFGF23-25	hFGF23-48	hFGF23-114	hFGF23-148	hFGF23-170	hFGF23-180	hFGF23-210	hFGF23-237
培养物上清液								
1C3H	0.053	0.043	0.043	0.041	0.037	0.240	0.039	0.036
1D6A	0.056	0.051	0.049	0.045	0.044	0.040	0.038	2.058
2A2B	0.052	0.048	0.043	0.321	0.040	0.037	0.036	0.040
2C3B	0.056	0.046	0.043	0.038	0.039	0.038	0.041	0.041
对照组	0.059	0.047	0.048	0.051	0.043	0.044	0.045	0.043

(2) 实验 2: 与固定化的肽相结合

对于 FGF-23, 观察到切割发生在 SEQ ID NO:1 所示的第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间。为了详细检测识别切割位点至 C-末端的区域的抗体, 利用含有相应部分区域的序列的合成肽进行了结合实验。利用 50mM 的碳酸氢钠溶液将实施例 5 中合成的肽(SEQ ID NOS: 14, 15, 16 和 17)和实施例 8 中合成的肽(SEQ ID NOS: 23 和 24)稀释到 1 μ g/ml。50 μ l 的这种溶液加入到 ELISA 系统 (Maxisorp(商标), Nunc, 美国) 中的 96 孔板中, 然后将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 培育 12 小时以使其固定在平板上。接下来, 除去反应溶液, 向每孔中加入 50 μ l 的封闭溶液 (Superblock(商标), PIERCE, 美国), 然后室温培育 60 分钟, 以停止反应的进行。在溶液除掉以后, 向每一个孔中加入 50 μ l 用含有 10% 封闭溶液 (SuperBlock(商标), PIERCE, 美国) 的 T-TBS 溶液稀释实施例 3 和实施例 4 中纯化得到的 1D6A 和 3C1E 抗体至其浓度为 10 μ l/ml。作为对照, 向一孔中加入 50 μ l 含有 10% 封闭溶液 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液。将该溶液在室温培育 1 小时, 这样固定化的肽可与抗体进行反应。在抗体反应的后期, 利用 T-TBS 溶液洗涤孔 4 次, 取 50 μ l 稀释后 (稀释方法为: 利用一种含 10% 阻滞溶液 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(H+L)-F(ab')₂ 片段至 3000 倍) 的溶液加入进每一孔中。将该溶液在室温培育 60 分钟以同次级抗体发生反应。经过 T-TBS 溶液洗涤每孔 4 次以后, 向每个孔中加入 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (DAKO, 丹麦), 是一种过氧化物生色底物, 室温作用 20 分钟, 以使其发生颜色反应。然后, 向每一孔中加入 50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液以停止反应。利用一种用于 96 孔板的吸收峰测定系统 (MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本) 对溶液进行测定, 获得的测定值为 450nm 处的光吸收值减去 570nm 处的光吸收值。结果表示在 Table4。对于对照组孔板 (仅加有稀释溶液), 从 450nm-570nm 范围内获得的所有测定值均小于或等于 0.05。与其相反, 3C1E 抗体与 hFGF23-180 肽(SEQ ID NO:15)相结合, 1D6A 抗体与 hFGF23-237 肽(SEQ ID NO:17)相结合。

表 4
具有 FGF-23 的部分序列的固定化肽与纯化后单克隆抗体的反应活性

		固定化抗体							
		hFGF23-170	hFGF23-174	hFGF23-180	hFGF23-197	hFGF23-210	hFGF23-220	hFGF23-237	对照组
纯化后的抗体									
1D6A	0.041	0.051	0.047	0.050	0.055	0.054	3.412	0.060	
3C1E	0.037	0.043	0.203	0.041	0.040	0.051	0.042	0.045	
对照组	0.038	0.041	0.035	0.036	0.042	0.048	0.043	0.048	

实施例 10 利用免疫沉淀法检测 FGF-23 蛋白和从 FGF-23 蛋白衍生出的多肽

应用免疫沉淀法的目的在于：为了揭示获得的单克隆抗体与 FGF-23 和从 FGF-23 衍生出的多肽在液相中（与固定化的肽相比，更接近生理条件）进行反应的活性，沉淀的蛋白可以利用 Western 印迹法进行检测。

实施例 2 中制备的表达 FGF-23H 的 CHO-FGF23 细胞在 CHO-S-SFM II 介质(Gibco BRL, 美国)中培育 4 天, 这样可得到包含有 FGF-23 蛋白, N-末端多肽片段, 和 C-末端多肽片段的培养物上清液。每 400 μ l 的上清液中分别加入 0.5 μ g 实施例 3 和实施例 4 中制备的抗 FGF-23 单克隆抗体 5 种类型中的 1 种, 以制备溶液。一组仅添加缓冲溶液的样作为对照溶液。利用上下摇荡的方式将这些溶液在 4 $^{\circ}$ C 混合 1.5 小时以确保抗体同培养物上清液中的蛋白发生反应。接下来, 30 μ l 的 G 蛋白 4FF 琼脂糖(凝胶)(美国 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司)加入到反应液中, 利用上下摇荡的方式将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 混合 3 小时, 然后利用 PBS 溶液洗涤树脂 3 次, 这样未结合到树脂上的物质就被洗涤掉了。取一半洗涤后的树脂, 向其中加入 30 μ l 的 20mM 的含有 DDT 的缓冲溶液和 20mM 的不含 DDT 样品的缓冲溶液(50mM 的 Tris-Cl 溶液, pH 为 6.8, 1% 的 SDS 溶液, 10% 的甘油溶液, 0.001% 的溴酚蓝溶液, 2mM 的乙二胺四乙酸(EDTA)溶液)。将该溶液在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟后进行离心分离, 收集分离后的上清液。对这样采集到的免疫沉淀物利用浓度为 10% - 20% 的浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。利用一种半干印迹转移槽(Owl Separation Systems, 美国)将凝胶中的蛋白转移到一种固定化的聚偏氟乙稀膜(美国 Millipore 公司)上。利用一种阻滞溶液(Blockace(商标), 日本制药公司)阻滞 PVDF 膜以后, 在一种生物素标记的 2A2B 抗体或 1C3E 抗体(这两种抗体均溶解在 T-TBS 溶液中, 将抗体稀释到 1 μ g/ml)溶液中进行 4 $^{\circ}$ C 培育 12 小时。而且, HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素(DAKO, 丹麦)同生成物进行反应。经过洗涤之后, 将生成物利用一种 ECL Plus 发光系统(一种电化学发光脉冲系统, 美国 Amersham

Pharmacia 生物技术有限公司) 曝光到一张胶片上 1 小时, 然后胶片用自动处理器进行处理(日本富士胶片公司)。其结果如图 3 所示。用于 Western 印迹实验的 2A2B 抗体识别的位点相当于 SEQ ID NO:1 中的长为 148 至 163 位的氨基酸序列。而且, 该实验所用的 1C3H 抗体表明可识别一个相当于 SEQ ID NO:1 中的长为 180 至 194 的氨基酸序列的位点。利用这两种抗体, 可区分并识别由介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割所产生的多肽片段与其它的多肽。本实验的一个结果, 单克隆抗体被分为下面的 3 种类型。具体地说, 即为:

5 (1) 两种类型的抗体(2C3B 抗体和 2C5L 抗体)在相应于 SEQ ID NO:1 中的第 25 位和第 179 位之间的氨基酸序列的 N-末端多肽内有一个识别序列, 或者与 N-末端多肽片段和 FGF-23 全长蛋白形成免疫复合体; (2) 两种类型的抗体(1D6A 抗体和 3C1E 抗体)在相应于 SEQ ID NO:1 中的第 180 位和第 251 位之间的氨基酸序列的 C-末端多肽内有一个识别序列, 并与 C-末端多肽片段和 FGF-23 全长蛋白形成免疫复合体; (3) 一种抗体(2A2B 抗体)未检测到免疫沉淀物。

10 15

实施例 11 利用抗 FGF-23 的单克隆抗体和抗 FGF-23 的多克隆抗体通过 ELISA 测定 FGF-23 蛋白

2 种类型的单克隆抗体(1D6A 抗体和 2C3B 抗体)分别固定化, 然后利用 5 种类型的多克隆抗体(hFGF23-25 抗体, hFGF23-170 抗体, hFGF23-180 抗体, hFGF23-210 抗体, 和 hFGF23-237 抗体。这 5 种类型的多克隆抗体在实施例 7 中表明其作为检测抗体是有效的)中的一种通过夹心式 ELISA 系统对纯化后 FGF-23 蛋白进行了测定。

20

利用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释上述经由一种 G 蛋白亲和层析柱纯化过的两种类型的单克隆抗体, 使稀释后单克隆抗体的浓度为 10 μ l/ml。50 μ l 的这种溶液加入到 ELISA 系统(Maxisorp(商标), Nunc, 美国)的 96 孔板中, 然后将该溶液在 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时以进行固定化。接下来, 除去反应溶液, 向每孔中加入 50 μ l 的阻滞溶液(Superblock(商标), PIERCE, 美国), 然后在室温培育 30 分钟, 以阻滞反应的进行。在溶液除掉以后, 利用含吐温 20 为 0.05% 的 PBS(T-PBS)溶液洗涤每个孔 3 次。每个孔中加入 50 μ l 浓度均为 0.1 μ g/ml 的下列溶液之一: 纯化后的 FGF-23H 蛋白, 纯化后的 N-末端多肽片段, 和纯化后

25 30

的具有 6 组氨基酸标记的 C-末端多肽片段。将该溶液在室温培育 2 小时以使其和固定化抗体进行反应。抗体经过反应后, 利用 T-TBS 溶液洗涤孔 3 次。5 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 部分肽的多克隆抗体 (hFGF23-25 抗体, hFGF23-170 抗体, hFGF23-180 抗体, hFGF23-210 抗体, 和 hFGF23-237 抗体) 利用含阻滞溶液为 0.05 % 的 T-TBS 溶液稀释到 2.5 μ g/ml, 将该溶液在室温培育 30 分钟以进行次级抗体反应。利用 T-TBS 溶液洗涤每个孔 3 次之后, 利用含阻滞溶液为 10 % 的 (Blockace(商标), 日本制药公司) T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素 (DAKO, 丹麦) 溶液至 5000 倍, 取 50 μ l 稀释后的溶液加入进每个孔中, 将该溶液在室温培育 30 分钟以使抗生物素蛋白链菌素与生物素标记的抗体相结合。利用 T-TBS 溶液洗涤每一个孔 4 次之后, 将 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (是一种过氧化物生色底物, DAKO, 丹麦) 加入到每一个孔中, 接下来在室温进行培育。7 分钟之后, 50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液加入到每一孔中以停止反应。利用一种测定 96 孔板的光吸收值的系统 (MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本) 进行测定, 获得的测定值为 450nm 处的光吸收减去 570nm 处的光吸收。结果如图 4 所示。对于没有加抗体的对照组, 从 450nm-570nm 范围内获得的所有测定值均小于 0.015 或低于 0.015。然而, 倚赖于固定化抗体和检测用抗体的结合, 反应对于 FGF-23 全长蛋白 (图 4A), N-末端多肽片段 (图 4B), 和 C-末端多肽片段 (图 4C) 而言是特异性的。基于在反应活性上的差别, 能够证实抗 FGF-23 单克隆抗体的识别位点。尤其是, 利用 2C3B 抗体的重组体作为一种固定化抗体, 3 种类型的生物素化了的的多克隆抗体 (hFGF23-180 抗体, hFGF23-210 抗体, 和 hFGF23-237 抗体) 之一作为检测抗体, 对全长 FGF-23 蛋白进行了检测。但是, 既没有检测到 N-末端多肽片段, 也没有检测到 C-末端多肽片段。另一方面, 利用生物素标记的可识别 N-末端多肽片段的多克隆抗体 (hFGF23-25 抗体和 hFGF23-170 抗体) 检测到了全长 FGF-23 蛋白和 N-末端多肽片段, 但没有检测到 C-末端多肽片段。

因此, 这就证实了 2C3B 抗体能够识别 N-末端多肽片段。当 1D6A 抗体被固定时, 利用多克隆抗体作为识别 N-末端多肽片段的检测抗

体, 检测全长蛋白。但是, 未检测到 N-末端多肽片段和 C-末端多肽片段。另一方面, 当利用多克隆抗体作为识别 C-末端多肽片段的检测抗体, 检测全长蛋白和 C-末端多肽片段时, 利用 1D6A 抗体与 hFGF23-180 结合的检测方法是可行的。这些结果表明 1D6A 抗体可
5 与 hFGF23-237 多克隆抗体竞争, 这样就证实了可识别 SEQ ID NO: 1 中的介于第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的一段区域。

实施例 12 利用组合的抗 FGF-23 的单克隆抗体通过夹心式 ELISA 法检测 FGF-23 蛋白

纯化后的 FGF-23 蛋白利用实施例 3 和实施例 4 中获得的 4 种固定类型的抗 FGF-23 的单克隆抗体通过夹心式 ELISA 法进行检测, 这
10 4 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 的单克隆抗体为实施例 6 中作为检测抗体而制得的。

利用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释 4 种类型的 FGF-23 单克隆抗体 (1D6A 抗体, 2A2B 抗体, 2C3B 抗体, 和 3C1E 抗体) 至浓度为
15 10 μ g/ml。50 μ l 的这种溶液加入到 ELISA 系统 (Maxisorp(商标), Nunc, 美国) 的 96 孔板中, 然后在 4 $^{\circ}$ C 培育 12 小时以进行固定化。接下来, 除去反应溶液, 向每孔中加入 50 μ l 的阻滞溶液 (Superblock(商标), PIERCE, 美国)。生成物在室温培育 20 分钟, 以阻滞反应的进行。在溶液除掉以后, 利用含吐温 20 为 0.1% 的 TBS(T-TBS)溶液洗涤每个孔 3 次。每个孔中加入 50 μ l 浓度均为 0.1 μ g/ml 的纯化后的 FGF-23 蛋白溶液。将该溶液在室温培育 1 小时以使其和固定化抗体进行反应。抗体经过反应后, 利用 T-TBS 溶液洗涤孔 4 次。3 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 单克隆抗体 (1D6A 抗体, 2C3B 抗体, 和 3C1E 抗体) 利用含阻滞溶液为 10% 的 T-TBS 溶液稀释到 10 μ g/ml, 取这
20 样的溶液加入每一孔板中。将该溶液在室温培育 1 小时以进行次级抗体反应。利用 T-TBS 溶液洗涤每一个孔 4 次之后, 利用含阻滞溶液为 10% 的 (Blockace(商标), (日本制药公司) T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素 (DAKO, 丹麦) 溶液至 5000 倍, 取 50 μ l 稀释后的溶液加入进每一孔中, 将该溶液在室温培育 20 分钟以使抗
25 生物素蛋白链菌素与生物素标记的抗体相结合。利用 T-TBS 溶液洗
30 涤每个孔 4 次并且将 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (是一种过氧化物生色底

物, DAKO, 丹麦) 加入到每一个孔中, 接下来在室温进行培育。30分钟之后, 50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液加入到每一孔中以停止反应。测定通过利用一种测量 96 孔板的光吸收值的系统(MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本)而进行, 测量值为 450nm 下的光吸收值减去 570nm 下的光吸收值。结果如表 6 所示。对于没有加固定化抗体或检测抗体的对照组, 从 450nm-570nm 范围内获得的所有测定值均小于 0.033 或等于 0.033。然而, 倚赖于固定化抗体和检测用抗体的结合, 观察到光吸收值有增加的现象。举例来说, 当进行夹心式 ELISA 实验时, 利用 2C3B 抗体作为固定化抗体(在 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白的氨基酸序列中的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的区域内具有一个识别位点), 生物素标记的 1D6A 和 3C1E 抗体作为检测用抗体(在 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白的氨基酸序列中的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的区域内具有识别位点), 得到的所有 450nm-570nm 的光吸收值均高达 2.9 或更高。由 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白的氨基酸序列中的介于第 179 位精氨酸和第 180 位丝氨酸之间的切割所得到的多肽片段以该种方式通过夹心式 ELISA 实验从被测定的序列中去除掉了。因此, 利用这样一种抗体的重组体, 不用识别 N-末端多肽片段或 C-末端多肽片段就能够将未切割的 FGF-23 蛋白高灵敏度地检测出来。当将实施例 2 中制备的全长 FGF-23H 蛋白, N-末端多肽片段, 和 C-末端多肽片段以与以前报道相似的方式接种小鼠时, 仅在全长 FGF-23H 蛋白的病例中出现了血清中磷的量诱导降低的现象。因此, 如 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白的氨基酸序列中的介于第 179 位精氨酸和第 180 位丝氨酸之间的切割极大的改变了 FGF-23 蛋白的活性。利用这里所示的方法(包括去除切割的多肽的同时, 选择性检测未切割的 FGF-23H 蛋白), 可以更加精确地检测和测定样品中具有活性的 FGF-23。另一方面, 当如 SEQ ID NO:1 所示的 FGF-23 蛋白的氨基酸序列中的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的区域内具有识别位点的 1D6A 抗体和 3C1E 抗体被作为固定化抗体, 并且生物素标记的 1D6A 抗体和 3C1E 抗体也被用于检测用抗体时, 通过抗体间的竞争相似地表明了具有可识别如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的

介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的区域的 3C1E 抗体组其识别位点与具有可识别如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的介于第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的区域的 1D6A 抗体的识别位点不同。而且，实验还表明结合使用这些抗体可以建立一种测定方法，利用该测定方法可除去位于 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的多肽片段，并且可以高灵敏度检测出第 180 位至第 251 位残基之间的 C-末端多肽片段。

表 5

结合利用抗 FGF-23 的单克隆抗体（作为固定化抗体）和生物素化的抗体（作为检测抗体）通过夹心式 ELISA 法检测 FGF-23 蛋白获得的光吸收值。

	固定化抗体			
	1D6A	2C3B	3C1E	无
检测抗体				
1D6A	0.038	3.469	3.131	0.015
2C3B	1.287	0.466	> 3.5	0.015
3C1E	1.549	> 3.5	0.058	0.033
无	0.020	0.024	0.023	0.022

实施例 13 利用抗 FGF-23 的单克隆抗体通过夹心式 ELISA 法定量测定 FGF-23 蛋白

利用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释 2C3B 抗体至浓度为 10μg/ml。50μl 的这种溶液加入到 ELISA 系统（Maxisorp(商标)，Nunc，美国）的 96 孔板中，然后在 4℃培育 12 小时以进行固定化。接下来，除去反应溶液，向每孔中加入 250μl 的阻滞溶液（Superblock(商标)，PIERCE，美国），然后生成物在室温培育 20 分钟，以阻滞反应的进行。在溶液除掉以后，利用含吐温 20 为 0.1% 的 TBS(T-TBS)溶液洗涤每一个孔 2 次。利用含阻滞溶液（SuperBlock(商标)，PIERCE，美国）为 10% 的 T-TBS 溶液稀释实施例 2 中纯化后得到的 FGF-23 蛋白，得到一组浓度分别为 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 或 0.003ng/ml 的 FGF-23 蛋白溶液。每种溶液取 50μl 加入到每个孔中。将该溶液在

室温培育 1 小时以使其和固定化抗体进行反应。抗体经过反应后，利用 T-TBS 溶液洗涤孔 4 次，2 种类型的生物素标记的抗 FGF-23 单克隆抗体（1D6A 抗体和 3C1E 抗体）利用含封闭溶液（Blockace(商标)，（日本制药公司）为 10% 的 T-TBS 溶液稀释到 10 μ g/ml，取这样的

5 溶液加入每一孔板中。将该溶液在室温培育 30 分钟以进行次级抗体反应。利用 T-TBS 溶液洗涤每一个孔 4 次之后，利用含阻滞溶液为 10% 的（Blockace(商标)，（日本制药公司）T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素（DAKO，丹麦）的溶液至 5000 倍，取 50 μ l 稀释后的溶液加入进每一孔中。将该溶液在室温培育 30 分钟以使抗

10 生物素蛋白链菌素与生物素标记的抗体相结合。利用 T-TBS 溶液洗涤每个孔 4 次后，将 50 μ l 的 N-四甲联苯胺（是一种过氧化物生色底物，DAKO，丹麦）加入到每个孔中，接下来在室温进行培育。25 分钟之后，50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液加入到每一孔中以停止反应。测定通过利用一种测量 96 孔板的光吸收值的系统（MTP-300，

15 CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本）而进行，测量值为 450nm 下的光吸收值减去 570nm 下的光吸收值。结果如图 6 所示。由于 FGF-23 蛋白（浓度至少为 0.03ng/ml）的存在，观察到了测定值的显著增大，并且在 0.03 - 大约 3ng/ml 的浓度范围之内，获得了在 450nm - 570nm 范围内所有测定值具有浓度倚赖性增加的结果，表明在该浓度

20 范围之内可测定 FGF-23 蛋白。

实施例 14 抗 FGF-23 单克隆抗体固定层析柱的制备

利用一种商业化的固定试剂（SulfoLink(商标)，PIERCE，美国）制备了一种固定化的抗 FGF-23 抗体的层析柱，该层析柱通过免疫沉淀方法在收集 FGF-23 蛋白或纯化 FGF-23 蛋白方面是有效的。将 1C3H

25 抗体，1D6A 抗体，和 2C3B 抗体在 pH 值为 6.0，浓度为 0.1M 的磷酸盐缓冲液（含 5mM 的乙二胺四乙酸）中进行稀释，分别制得浓度为 1mg/ml，1mg/ml，和 0.4mg/ml 的溶液。向 1ml 的这种抗体溶液中加入 6mg 的 2-巯基乙醇胺，所得溶液在 37 $^{\circ}$ C 以上下摇荡的方式混合 1 小时，然后，抗体内的二硫键通过约简反应被切割。当缓冲液利用

30 1.5ml 的一种结合缓冲溶液（50mM 的 Tris/HCl 溶液，pH 值为 8.5，5mM 的 EDTA）在 NAP 10 层析柱（美国 Amersham Pharmacia 生物技术有

限公司)中进行交换时,除掉 2-巯基乙醇胺以停止约简反应。这些抗体溶液加入到已利用结合缓冲溶液洗涤过的 1ml 的 SulfoLink(商标)结合凝胶(PIERCE, 美国)中。该溶液在室温以上下摇荡的方式混合 30 分钟以进行结合反应。经过离心过滤后,利用一种结合缓冲液
5 对树脂进行洗涤。为了阻滞未反应的硫醇基,加入 1ml 浓度为 0.05mM 的左旋半胱氨酸-盐酸溶液,然后将该溶液在室温以上下摇荡的方式混合 30 分钟。接下来,利用 1M 的氯化钠溶液洗涤树脂以除去未反应的抗体和左旋半胱氨酸。

实施例 15 利用免疫沉淀法对存在于 CHO-FGF23H 细胞转导小鼠
10 中的 FGF-23 蛋白进行检测

为了检测 FGF-23 蛋白在血液中的存在状态,表达 FGF-23H 的细胞被转移至裸鼠中,然后,由这些细胞分泌到血液中的 FGF-23H 蛋白利用免疫沉淀法检测到了。 2×10^7 的 CHO-FGF23H 细胞,或 CHO ras 克隆 1 细胞作为对照以皮下转导方式转导至每一只 Balb/c 裸鼠中。
15 转导后的第 32 天,从细胞已成功粘附形成肿瘤的小鼠中采集血清。将从 5 只 CHO ras 克隆 1 转导小鼠中采集到的血清和从 6 只 CHO-FGF23H 转导的小鼠中采集到的相同量的血清以相同的体积各自独立地混合。向 150 μ l 各自混匀的血清中分别加入下列物质: 10 μ l 实施例 14 中制备的已固定上 1D6A 抗体的树脂, 10 μ l 实施例 14 中制备的已
20 固定上 2C3B 抗体的树脂,和 10 μ l 未固定抗体的树脂。将生成物在 4 $^{\circ}$ C 以上下摇荡的方式混合 1 小时。以利于抗体和 FGF-23 进行反应。利用 PBS 溶液洗涤该树脂 3 次以除去未反应的产物。向每一种树脂中加入一种 50 μ l 的缓冲液(50mM 的 Tris-Cl 溶液, pH 值为 6.8, 1% 的 SDS 溶液, 10% 的甘油溶液, 0.001% 溴酚蓝溶液, 2mM 的 EDTA
25 溶液,和 20mM 的 DDT 溶液)。生成物在 95 $^{\circ}$ C 加热 5min, 然后进行离心分离。收集这样得到的上清液。利用浓度为 10% - 20% 的梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳对上清液进行分离, 通过一种半干印迹转移槽(Owl Separation Systems, 美国)将凝胶中的蛋白转移到一种聚偏氟乙烯膜(美国 Millipore 公司)上。聚偏氟乙烯膜在经由(Blockace(商
30 标), 日本制药公司)稀释至 0.5 μ g /ml 的一种生物素标记的 2A2B 或 1C3H 抗体溶液中在 4 $^{\circ}$ C 条件下培育 12 小时。而且, HRP 标记的

抗生物素蛋白链菌素 (DAKO, 丹麦) 同生成物进行反应。利用一种 ECL Plus 发光系统 (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 将混合溶液暴露于胶片上 1 小时, 然后用自动处理器 (日本富士胶片公司) 进行处理。结果如图 7 所示。对于没有固定化抗体的树脂, 根本就没有检测到信号分子。然而, 当利用 1C3H 抗体进行免疫沉淀, 利用 2A2B 抗体作检测之用时, 检测到了一种 22kDa 的信号分子。当利用 1C3H 抗体进行检测之用时, 检测到了 22kDa 和 10 kDa 的信号分子。此外, 当利用 1D6A 抗体进行免疫沉淀, 利用 2A2B 抗体作检测之用时, 未检测到 22kDa 的信号分子, 当 1C3H 抗体作为检测之用时, 仅检测到了一种 10 kDa 的信号分子。而且, 当利用 2C3B 抗体进行免疫沉淀和利用 2A2B 抗体作检测之用时, 检测到了 22kDa 和 16kDa 的信号分子, 当利用 1C3H 抗体进行检测时, 仅检测到了一种 22 kDa 的信号分子。表明 2A2B 抗体可识别 SEQ ID NO:1 中的介于第 148 位和第 163 位氨基酸残基之间的区域, 1C3H 抗体可识别 SEQ ID NO:1 中的介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的区域。而且, 通过 Western 印迹法实验表明 2A2B 抗体可识别 N-末端多肽片段 (该片段相当于 SEQ ID NO:1 所示的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间一段序列), 通过电泳检测信号分子的分子量为 16 kDa。已经表明 1C3H 抗体可识别如 SEQ ID NO: 1 所示的介于第 180 位和第 251 位氨基酸残基之间的 C-末端多肽片段, 检测到的信号分子的分子量为 16 kDa。因此, 这就清楚的表明了该实验中测定到的 16 kDa 的信号分子是 N-末端多肽片段, 10 kDa 的信号分子表明是 C-末端多肽片段。此外, 从小鼠血清中采集到的分子量为 22 kDa 的多肽能够被下列抗体所识别: 能识别第 25 位至第 179 位氨基酸残基之间的 N-末端区域的 2C3B 抗体; 能识别第 148 位至第 163 位氨基酸残基之间区域的 2A2B 抗体, 和由 1C3H 产生的能识别介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的抗体, 但该多肽不能被 1D6A 抗体所识别 (该抗体能识别如 SEQ ID NO:1 所示的介于第 237 位和第 251 位氨基酸残基之间的区域)。本实验中观察到的分子量大约为 22 kDa 的信号分子可能由 FGF-23 蛋白的切割产生, 切割位点位于 1C3H 抗体识别区域的 C-末端。在对血清进行测定的实验中观察到了与发生于 SEQ ID NO:1 所示的第 179

位精氨酸和第 180 位丝氨酸之间的切割不同的切割和由切割产生的片段，对此我们予以了注意。

实施例 16 血清中 FGF-23 蛋白的切割

(1) 大鼠血清和纯化后的 FGF-23 蛋白的混合实验

5 通过混合纯化后的 FGF-23 蛋白和大鼠血清对血清中 FGF-23 蛋白的切割进行了检测。大鼠血清加入到 20ng 纯化后的 FGF-23 蛋白中，得到最终浓度为 50 %。将两种溶液混合并进行培养 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 和 24 小时。通过聚丙烯酰胺电泳分离溶液，然后通过一种半干印迹转移槽 (Owl Separation Systems, 美国) 将凝胶中的蛋白转移
10 移到一种聚偏氟乙烯 (美国 Millipore 公司) 膜上。利用 2A2B 抗体通过 Western 印迹法进行测定，可测定由纯化后的 FGF-23 蛋白衍生得到的代谢物。其结果如图 8 所示。和血清混合以后，存在于溶液中的全长 FGF-23 蛋白的数量随培育时间的增加而降低，并且观察到了分子量为 22 kDa 的新片段的出现及增加。

15 (2) 人的血清或血浆与纯化后的 FGF-23 蛋白的混合实验

将人的血清或人血浆以最后 50 % 的浓度加入到 20ng 的纯化的 FGF-23 蛋白，接着在 37℃ 温育 3 小时。将溶液通过聚丙烯酰胺凝胶分离，然后将凝胶上的蛋白利用半干印迹系统 (Owl 分离系统, 美国) 转移到 PVDF 膜上 (Millipore 美国)。利用 2A2B 抗体通过 Western
20 印迹法进行测定，可测定由纯化后的 FGF-23 蛋白衍生得到的代谢物。其结果如图 9 所示。当人的血清与 FGF-23 蛋白混合时，出现了一条分子量为 22 kDa 的条带。但是，当人的血浆与 FGF-23 蛋白混合时，未出现一条分子量为 22 kDa 的条带。因此，推断该 22 kDa 的条带来源于存在于血清中的蛋白切割酶。

25 实施例 17 切割 FGF-23 蛋白的酶的鉴定

(1) 凝血酶作用下的 FGF-23 的切割

凝血酶 (美国 Sigma 公司) 加入到 20ng 纯化后的 FGF-23 蛋白中，得到最终浓度为 1 单位/ml 的溶液，接下来培育 3 小时。将培育后的溶液利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，然后通过一种半干印迹转移
30 槽 (Owl Separation Systems, 美国) 将凝胶中的蛋白转移到一种 PVDF 膜 (美国 Millipore 公司) 上。利用 2A2B 抗体通过 Western 印迹法进

行测定,可测定由纯化后的 FGF-23 蛋白衍生得到的代谢物。其结果如图 10 所示。全长 FGF-23 蛋白消失,并且其带转换成 22kDa 的带。

(2) 水蛭素对血清中 FGF-23 蛋白切割的抑制作用

为了检测血清中凝血酶对 FGF-23 切割的作用,对水蛭素(已知其作为一种凝血酶选择性抑制剂)的效果进行了检测。以最后浓度为 50%,在 20ng 的纯化的 FGF-23 蛋白中加入大鼠血清,接着温育 4 小时。而且,加入大鼠血清的同时,加入了浓度为 1.0 单位/ml 的水蛭素,接下来进行类似的温育。将该溶液利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,然后将凝胶中的蛋白利用一种半干印迹转移槽(Owl Separation Systems, 美国)转移到一种 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)上。利用 2A2B 抗体通过 Western 印迹法进行测定,可测定由纯化后的 FGF-23 蛋白衍生得到的代谢物。其结果如图 11 所示。对于加入大鼠血清的溶液,一些 FGF-23 蛋白转化成了 22 kDa 的多肽,并且由于水蛭素的存在,抑制了 22 kDa 条带的出现。所以,实验表明血清中产生的 FGF 蛋白的切割是由于凝血酶或与其类似的酶。

实施例 18 血清中 FGF-23 蛋白切割位点的鉴定

为了鉴定血清中 FGF-23 的切割位点,10 μ g 纯化后的 FGF-23 蛋白和大鼠血清混合 24 小时,由此产生 22 kDa 的多肽。该溶液中 22 kDa 的多肽被吸附于实施例 14 中制备的抗 1C3H 的抗体柱上,洗脱,并纯化。用于此处的抗体柱通过在 500 μ l 固定链霉抗生素的树脂(美国 Amersham Pharmacia 生物技术有限公司)上吸附 200 μ g 生物素化的 1C3H 抗体而制得。衍生得到的 FGF-23 蛋白利用 0.1M 的甘氨酸溶液(pH 值为 2.7)从抗体柱上洗脱。这样纯化的多肽通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,用 CBB 进行染色,以致可以如图 12 中所示鉴定纯化的 22kDa 多肽。切出这条带,进行 MALDI-TOF MS 分析。基于从该分析中得到的分子量,表明这种 22 kDa 的多肽具有如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的从第 25 位酪氨酸至第 196 位精氨酸之间的一段序列。

这些结果显示:在血清中,FGF-23 蛋白被血清中的凝血酶在 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的从第 196 位精氨酸之后的位置进行切割,然后,转换成 SEQ ID NO:1 中的介于第 25 位和第 196 位氨基酸

残基之间的一段序列所示的多肽。如上所述，测定血液中具有活性的 FGF-23 蛋白需要检测 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列中的介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间未进行切割的多肽。实验表明具有活性的全长 FGF-23 蛋白在制备血清样品过程中在第 196 位和第 197 位氨基酸残基之间发生了部分切割，识别 C-末端的抗 FGF-23 单克隆抗体不能识别由其本身产生的代谢物。尤其是，当利用可识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的区域的一种抗体，和可识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的介于第 180 位和第 196 位氨基酸残基之间的区域的一种抗体结合进行夹心式 ELISA 实验时，血清制备过程中所导致的切割效应可以忽略不计。然而，当利用一种可识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的区域的抗体，和一种可识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的介于第 197 位和第 251 位氨基酸残基之间的区域的抗体时，与血浆相比，血清中的测定值可能下降。在得到的抗 FGF-23 的单克隆抗体中，1C3H 抗体和 3C1E 抗体可识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的介于第 180 位和第 194 位氨基酸残基之间的区域。因此，血清中 FGF-23 的切割得到的 22 kDa 的蛋白（对应于 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的第 25 位和第 196 位氨基酸残基之间的一段序列）可被识别，其与在 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列中的介于第 179 位和第 180 位氨基酸残基之间的切割产生的多肽片段具有明显差异。因此，表明这些抗体在建立测定血清样品的方法中是非常有用。

实施例 19 对患有肿瘤诱导骨软化症病人中血清和血浆中 FGF-23 蛋白浓度的定量分析

已有报道表明在肿瘤诱导的骨软化症中，FGF-23 在肿瘤中过量的生成，已知该疾病可通过除去病原性肿瘤而治愈。但是，肿瘤诱导的骨软化症中的病原性肿瘤由于生长力弱，一般较小，经常很难辨别。因此，肿瘤诱导的骨软化症和低磷酸盐血症很难辨别诊断。因此，如果证明血液中 FGF-23 的浓度能够作为诊断肿瘤诱导的骨软化症的指示剂，就可发展一种定量测定血液中 FGF-23 浓度的方法，这样的方法在临床上非常有用的。

从肿瘤诱导的骨软化症病人中获得血清和血浆样品，利用抗 FGF-23 的单克隆抗体通过夹心式 ELISA 系统对分析物中的 FGF-23 进行定量分析。上述方法利用了抗 FGF-23 单克隆抗体和 ELISA 系统。2C3B 抗体用作固定化抗体，生物素标记的 3C1E 或 1D6A 抗体

5 用于检测用抗体。纯化的 2C3B 抗体用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释至 10 μ g/ml。向 ELISA (Maxisorp(商标), Nunc, 美国) 实验用的 96 孔板中的每个孔加入 50 μ l 得到的溶液，然后在 4 $^{\circ}$ C 温育 12 小时固定。随后，除去反应溶液，每孔中加入 250 μ l 的阻滞溶液 (SuperBlock(商标), PIERCE, 美国)，得到的溶液在室温培育 30 分钟，由此进行封闭。

10 溶液被除去之后，每一个孔用含有 0.1%吐温 20 的 TBS(T-TBS)溶液洗涤 2 次。为了避免与小鼠抗体发生非特异性反应，肿瘤诱导骨软化症病人的血清和血浆样品利用含有小鼠 IgG1 的 T-TBS 溶液稀释 2 倍，浓度为 80 μ g/ml 的小鼠 IgG1 作为同型对照。而且，为了确保与 FGF-23 蛋白发生特异性反应，样品均用含有过量体积(80 μ g/ml)的用于固定化的 2C3B 抗体的 T-TBS 溶液稀释 2 倍。产生标准曲线的标准溶液为通过向正常受试者的血清或血浆中添加纯化的 FGF-23 蛋白，用类似含有同型对照抗体的溶液进行稀释，最终形成浓度分别为 0.5, 0.25, 0.125, 0.061, 0.031, 和 0.015ng/ml 的溶液。加 50 μ l 各样品至微量滴定盘的每孔中，然后溶液在室温培育 1 小时，以使分析

20 物中的 FGF-23 蛋白与固定化的抗体发生反应。抗体反应完成之后，每一个孔用 T-TBS 溶液洗涤 4 次，然后向孔中加入两种类型用生物素标记的含有 10%阻滞剂 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释至 10 μ g/ml 的抗 FGF-23 的单克隆抗体的溶液 (含有 1D6A 抗体和 3C1E 抗体)。该溶液在室温培育 30 分钟，以进行次级抗体

25 反应。用 T-TBS 溶液将孔洗涤 4 次后，每孔加入 50 μ l 用含有 10%封闭液 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释 5000 倍的 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的抗生物素蛋白链菌素 (DAKO, 丹麦)。该溶液在室温培育 30 分钟，以使抗生物素蛋白链菌素与生物素标记的抗体相结合。每个孔用 T-TBS 溶液将孔洗涤 4 次，然后向

30 每孔加入 50 μ l 的 N-四甲联苯胺溶液 (是一种过氧化物酶生色底物, DAKO, 丹麦)，室温培育。30 分钟后，每孔加入 50 μ l 0.5M 的硫酸

溶液，以停止反应。利用一个测定 96 孔板 (MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本)的光吸收的系统进行测定,其值为 450nm 的吸收值减去 570nm 的吸收值。一个代表 FGF-23 特异性反应的吸收值为存在过量同型对照抗体时所测得的 450nm 的吸收值减去 570nm 的吸收值。结果见图 13。当 1D6A 抗体用作检测抗体时，血浆和血清样品的测量值分别为 0.033 和 0.008。测得的血清样品的吸收值明显低于血浆。另一方面，当 3C1E 用作检测抗体时，血清和血浆中样品的吸收值几乎完全相同。这些结果表明，如实施例 18 描述的在血清中切割那样，FGF-23 蛋白可能在样品中部分切割。因此，结果表明临床样品的测量值随上述检测用的抗体的不同而存在差异。因此，利用 3C1E 抗体作为一种检测抗体的夹心式 ELISA 系统也能够对血清中产生的切割产物进行测定，然后对肿瘤切除前后采集的血浆中 FGF-23 的浓度进行了测定。利用通过向正常受试者的血浆样品中加入不同浓度的纯化后的 FGF-23 蛋白而制得的标准溶液，基于纯化的蛋白量的增加光吸收值也增加的事实制得一条标准曲线。由此得到的标准曲线见图 14A。由此得到的标准曲线也能被用于在稀释了 2 倍的人的血清或血浆样品中利用检测变化范围介于 30pg/ml 和至少约 500pg/ml (该值在标准曲线中是一个明显增加的浓度值)之间定量分析 FGF-23 蛋白。在这样的条件下，从肿瘤诱导的骨软化症病人肿瘤切除之前的一天和肿瘤切除之后的一个月或更长时间对血浆样品中的 FGF-23 浓度进行了定量测定，测定结果见图 14B。肿瘤切除之前血浆样品中的 FGF-23 蛋白浓度约为 270pg/ml。但是，在肿瘤切除之后的样品中，FGF-23 蛋白浓度降至检测阈值(30pg/ml)或更少。因此，清楚表明在肿瘤诱导的骨软化症中，由于病原肿瘤的存在，血液中 FGF-23 以可检测到的浓度存在，肿瘤切除之后 FGF-23 蛋白的浓度显著降低。利用抗 FGF-23 单克隆抗体的 ELISA 法在诊断肿瘤诱导的骨软化症中非常有用，利用具有特异识别位点的抗体 (将血清中 FGF-23 的切割效应也考虑进来)，使定量测定成为可能。

实施例 20 用抗 FGF-23 单克隆抗体进行免疫组织学染色

肿瘤诱导的骨软化症中的病原肿瘤用一个抗 FGF-23 的单克隆抗体进行染色。将切除的一个肿瘤浸泡在一种包埋性溶液中，为冷冻做

好准备，冷冻剂使用液氮冷却的丙酮，由此制得冷冻的肿瘤结块。除此以外，将从肿瘤组织周缘确定为正常组织的部分切取一块作为对照，冷冻成结块。用低温保持器（CMI1900，LEICA，德国）将冷冻的结块切成厚度为 4 μ m 的薄片。该切片被粘附到 MAS 包被的载玻片上（MATSUNAMI GLAS IND., LTD., 日本），进行冷冻和干燥。由此制得的切片在零下 20℃ 下保藏。粘附上冷冻切片的载玻片在丙酮中于室温培育 5 分钟，以使组织固定在载玻片上。用磷酸盐缓冲液洗涤之后，在含有 1% 过氧化氢和 0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液中，室温培养 30 分钟，以使内生性过氧化物酶失活。随后，混合溶液用含有 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤，然后在含有 4% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液中室温培养 30 分钟，进行封闭反应。随后，在含有 10 μ g/ml 的生物素标记的 1C3H 和 2C3B 抗体的磷酸盐缓冲液中室温培养 1 小时，使组织中的 FGF-23 与加入的单克隆抗体发生反应。用含有 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤之后，用一个过氧化物酶试剂盒（Vectastain Elite ABC(商标)，VECTOR 实验室，美国）将山葵过氧化物酶与和组织特异性结合的生物素标记的单克隆抗体相结合。用含有 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液洗涤之后，进行过氧化物酶与底物（DAKO 液相 DAB 底物显色系统(商标)，DAKO，丹麦）的反应，然后用磷酸盐缓冲液中止反应。用离子交换水洗涤之后，在用离子交换水稀释 5 倍的苏木精染色液（Merck & Co., 美国）中室温培养 30 秒，然后用活水洗涤。接下来，用乙醇进行脱水，用二甲苯进行渗透，然后混合溶液用封装液封面。结果见图 15。认为与肿瘤组织中的 FGF-23 发生反应的位点被染成褐色。可是，没有在肿瘤周缘组织中观察到染色的影像。因此，确定在肿瘤诱导的骨软化症的病原性肿瘤中存在高浓度的 FGF-23。

实施例 21 小鼠 FGF-23 蛋白的表达与纯化

小鼠 FGF-23 的序列已经有过报道（Yamashita, T.等，生物化学与生物物理研究通讯，277: 494-498, 2000）。小鼠 FGF-23 的序列信息能通过搜索 NCBI 基因序列数据库而获得。基于由此得到的序列信息，利用嵌套 PCR 以获得编码小鼠 FGF-23 蛋白的 cDNA。扩增反应第一阶段使用的引物为：一个 mF5 引物（见 SEQ ID NO:25）和一个

mF3 引物 (见 SEQ ID NO:26) (5'端和 3'端不翻译的区域分别互补), 小鼠 FGF-23 蛋白的 cDNA 序列被合成。94℃保持 1 分钟后, 以从小鼠肺部取得的 cDNA (克隆技术公司, 美国) 为模板, 进行 30 个 PCR 循环。使用的酶为 LA-Taq DNA 聚合酶 (日本宝酒造公司), 每个循环包括: 94℃, 30 秒; 55℃, 30 秒; 72℃, 45 秒。接下来, 反应的第二阶段利用如下两个引物: 一个含有 SEQ ID NO:27 所示的从初始密码子至翻译区域的 mF23F 引物, 和一个含有 SEQ ID NO:28 所示的从翻译区域至终止密码子的 mF23R 引物。在 mF23F 引物中, 引入了一个克隆用的 *EcoR* I 限制酶识别序列和一个 Kozak 序列。同时, 在 mF23R 引物中, 在终止密码子后面引入了一个 *Not* I 限制酶识别序列。98℃保持 1 分钟后, 以第一阶段反应的反应溶液作为模板, 进行 35 个 PCR 循环。使用的酶为 PyroBest DNA 聚合酶 (日本宝酒造公司), 每个循环包括: 98℃, 10 秒; 58℃, 10 秒; 72℃, 60 秒。因此, 编码小鼠 FGF-23 蛋白的 cDNA 序列得以扩增。该 cDNA 被克隆至一个 pEAK8 载体 (Edge Biosystem, 美国) 的 *EcoR* I 位点和 *Not* I 位点。该载体即 pEAK8mFGF-23。而且, 根据实施例 1 中制备 FGF-23RQH 的方法, 构建小鼠的 FGF-23RQ, 其中引入一个突变, 即在小鼠的 FGF-23 切割酶识别位点以一个谷氨酸残基代替一个精氨酸残基。该突变的引入方法参见实施例 1(3)中所描述的方法。为了引入该突变, 合成了两个引物: 一个是正向引物 mRQF (见 SEQ ID NO:29), 另一个是反向引物 mRQR (见 SEQ ID NO: 30)。首先, 利用 pEAK8mFGF-23 为模板, 一个 mF23F 引物和 mRQR 引物的重组体, 和一个 mF23R 引物和 mRQF 引物的重组体, 进行 PCR 反应, 由此获得每种样品的 PCR 片段。接下来, 利用两种产物的混合物作为模板, 位于小鼠 FGF-23 cDNA 两个末端的一个 mF23F 和一个 mF23R 引物, 进行 PCR 反应, 由此扩增了引入突变的 FGF-23 cDNA 的片段。产物被克隆至一个 pEAK8/IRES/EGFP 质粒的 *EcoR* I 限制酶位点和 *Not* I 限制酶位点。混合溶液被纯化, 然后测定其核苷酸序列, 确保引入了靶突变的小鼠 FGF-23 cDNA 被成功克隆。命名其为 pEAK8/IRES/EGFP/mFGF-23RQ。该质粒还被引入到 CHO ras 克隆 1 细胞中, 加入 5μg/ml 的嘌呤霉素 (美国 Sigma 公司), 然后选择具有抗药性的细胞。克隆

完后，获得了小鼠表达 FGF-23 的细胞。这样的细胞命名为 CHO-mFGF23RQ。这样的 CHO-mFGF23RQ 细胞在辊式瓶中培养，由此获得了约 12 升的培养物上清液。根据实施例 2(3)中描述的纯化 FGF-23 蛋白的方法对该溶液进行纯化，由此获得了纯化的 FGF-23RQ。

5 本实验所用引物的序列如下：

mF5: ATTAGCCACTCGTGCTGTGCAATG (SEQ ID NO: 25)

mF3: GCAGCCTGGCCTGGGGACCTA (SEQ ID NO: 26)

mF23F : GGAATTCCACCATGCTAGGGACCTGCCTTAGACTC
(SEQ ID NO: 27)

10 mF23R :
ATAGTTTAGCGGCCGCCTAGACGAACCTGGGAAAGGGGCGACA
(SEQ ID NO: 28)

mRQF : TTCGCCCACGGCAACACACGCAAAGCGCCGAGGAC
(SEQ ID NO: 29)

15 mRQR : GTCCTCGGCGCTTTGCGTGTGTTGCCGTGGGCGAA
(SEQ ID NO: 30)

实施例 22 抗人 FGF-23 的单克隆抗体和 FGF-23 的交叉反应活性
利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化后的小鼠 FGF-23RQ 蛋白进行分离，转移到一种聚偏氟乙稀膜（美国 Millipore 公司）上，然后利用
20 3C1E 抗体进行 Western 印迹法测定。因此，得到了一条分子量大约为 32.5 kDa 的条带，如图 16A 所示。纯化后的小鼠 FGF-23RQ 蛋白溶液被系列稀释，然后通过利用抗人 FGF-23 的单克隆抗体的夹心式 ELISA 方法对其进行尝试性测定。这里所用的纯化后小鼠 FGF-23RQ 蛋白溶液的浓度未能精确的获得。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分
25 离条带，并进行测定，与纯化的已知浓度的人 FGF-23 蛋白进行比对，并用 CBB 染色。实验人员认为当以图 16B 所示的相对值为 10 进行表达时，小鼠 FGF-23RQ 蛋白溶液的浓度范围在 1 至 5 μ g/ml 之间。利用 2C3B 抗体作为固定化抗体，3C1E 抗体作为检测抗体对稀释后的小鼠 FGF-23RQ 蛋白溶液进行了测定。测定结果如图 16B 所示。
30 由于所得到的 450nm - 570nm 范围内的测定值随纯化后的小鼠 FGF-23RQ 蛋白溶液的浓度增加而增大，那么小鼠的 FGF-23 蛋白就能够

以一种浓度依赖方式利用抗人 FGF-23 单克隆抗体通过 ELISA 法进行检测了。而且,可证明抗人 FGF-23 的单克隆抗体能够识别小鼠的 FGF-23 蛋白,表明实施例 27 和 28 中所观察到的抗人 FGF-23 单克隆抗体通过结合小鼠的内生性 FGF-23 能中和或修饰其活性。

5 实施例 23 对患有遗传性血磷酸盐过少疾病的小鼠血液中的 FGF-23 蛋白进行检测

FGF-23 已知是一种诱导肿瘤诱导的骨软化症的因子,因为在 ADHR 的 FGF-23 基因中发现了错义突变,所以已知其也参与诱导 ADHR。然而,遗传性血磷酸盐过少疾病的另一种形式,XLH,尽管
10 已阐明其对应的基因,但目前对引发该疾病的机理还没有完全弄清。此外,该疾病和 FGF-23 的关系也是未知的。为了检测该疾病中 FGF-23 的参与情况,所以对 Hyp 小鼠(患有 XLH 疾病)血液中的 FGF-23 的浓度进行了尝试性测定。

ELISA 方法中利用 2C3B 抗体作为固定化抗体,生物素标记的
15 3C1E 抗体作为检测抗体进行测定。利用一种 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释纯化后的 2C3B 抗体至浓度为 10 μ l/ml。50 μ l 的生成物溶液加入到 ELISA 系统(Maxisorp(商标),Nunc,美国)中的 96 孔板中,然后将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 培育 12 小时以进行固定化。接下来,除去反应溶液,向每孔中加入 250 μ l 的阻滞溶液(Superblock(商标),PIERCE,
20 美国),然后在室温培育 30 分钟,以阻滞反应的进行。除掉溶液以后,每个孔用含有 0.1%吐温 20 的 TBS(T-PBS)溶液洗涤两次。从 27-30 周大小的同一窝出生的 Hyp 小鼠和正常的对照组小鼠眼眶中采集血样,然后制得血清样品。血清样品用含有 2C3B 抗体或一个小鼠 IgG1 抗体(作为同型对照)的 T-TBS 溶液稀释 2 倍,浓度为 40 μ g/ml。
25 每一种血清样取 50 μ l 加入进微量滴定盘的每个孔中,然后在室温培育 1 小时,这样可使分析物中的 FGF-23 蛋白与固定化抗体进行反应。经过抗体反应后,利用 T-TBS 溶液洗涤孔 4 次,然后向每个孔中加入稀释后的浓度为 2 μ l/ml 的 2C3B 抗体溶液(稀释方法为利用一种含 10%阻滞溶液(Blockace(商标),日本制药公司)的 T-TBS 溶液稀
30 释 2C3B 抗体至 2 μ l/ml)。将该溶液在室温培育 30 分钟以同次级抗体进行反应。经过 T-TBS 溶液洗涤每一个孔 4 次以后,取 50 μ l 稀释

后（稀释方法为：利用一种含 10%阻滞溶液（Blockace(商标)，日本制药公司）的 T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素（DAKO，丹麦）至 5000 倍）的溶液加入进每一孔中。该溶液在室温培育 30 分钟以使抗生物素蛋白链菌素和生物素标记的抗体相结合。利用 T-TBS 溶液洗涤每个孔 4 次，然后向每个孔中加入 50 μ l 的 N-四甲联苯胺（DAKO，丹麦），是一种过氧化物生色底物，在室温进行培育。30 分钟后，向每一孔中加入 50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液以停止反应。利用测量 96 孔板（MTP-300, CORONA ELECTRIC CO., LTD., 日本）的光吸收值的系统进行测定，得到的值(A450-A570)为 450nm 下的光吸收值减去 570nm 下的光吸收值。一个表明 FGF-23 特异性反应的光吸收值是通过如下方法获得的：在反应中加入同型对照获得的 A450-A570 值减去在反应中加入 2C3B 抗体作为吸收抗体获得的 A450-A570 值。结果如图 17 所示。图 17 清楚的表明了 Hyp 小鼠血液中 FGF-23 浓度的显著升高。由于 Hyp 小鼠患低磷酸盐血症是由于 PHEX 的基因缺陷，并且 XLH，人类的低磷酸盐血症，是由于 PHEX 基因的变异或缺陷所引起的，因此 Hyp 小鼠被认为是 XLH 模型小鼠。该结果有力的表明了血液中 FGF-23 浓度的升高可作为 XLH 中诱导低磷酸盐血症的一个因素。

实施例 24 FGF-23 和 1,25D 的相互控制作用

(1) 接种 FGF-23H 引起 1,25D 下降

纯化后的 FGF-23H 蛋白通过臀静脉给 6 只 6 周大的 BALN/c 雄性小鼠以每只小鼠 5 μ g 的剂量进行接种。接种 1, 4, 和 9 小时后，采集血样，并且对血液中 1,25D 的浓度进行了测定。结果如图 18A 所示。接种 FGF-23H 后 3 小时，观察到了血液中 1,25D 的浓度有了显著的下降，并且接种 9 小时后，其浓度进一步的降低。

(2) 接种 1,25D 诱导产生 FGF-23

给小鼠接种 1,25D，并且检测了血中 FGF-23 的浓度变化。6 只 7 周大的雄性小鼠构成一组。一组接种 0.025 μ g 溶于含有 0.05%吐温的磷酸盐缓冲液中的 1,25D，对照组接种含有 0.05%吐温的磷酸盐缓冲液。通过腹腔进行接种。接种后 8 小时，在麻醉状态下从小鼠的心脏中采集血样，然后制得了血清样品。利用如实施例 23 相同的方法通

过 ELISA 对这些血清样品进行检测，然后血液中的 FGF-23 的数量利用由人 FGF-23 蛋白标准溶液获得的标准曲线进行测定。这些结果如图 18B 所示。接种 1,25D 后 8 小时，观测到了血中 FGF-23 浓度的显著升高。

5 所以，结果表明 FGF-23 与 1,25D 具有密切的相互作用关系。

实施例 25 患有肾功能衰竭性高磷酸盐血症的病人血液中的 FGF-23 浓度

给七周大小的威斯塔氏小鼠服用 CE-2(日本 CLEA 公司，该 CE-2 已经以 0.75 % 的一种比例混合了腺嘌呤)，这样可在威斯塔氏小鼠体
10 中产生一种肾功能衰竭性高磷酸盐血症模式。作为一对照组，同样给威斯塔氏小鼠服用 CE-2(未混合腺嘌呤)。服用混合药剂 3 周后，从臀动脉中采集血样，收集血清。采集血样后，兔子饲养在代谢性笼舍中并采集尿样 24 小时。对血清中的磷酸盐浓度进行测定。结果如图 19A 所示。血清和尿中的肌酐酞利用一种商业化的试剂盒(CRE-
15 Ag Kainos(商标)，KAINOS 实验室，INC.，日本)通过一种酶法进行测定。结果如图 19B 所示。而且，利用 2C3B 抗体作为一种固定化抗体和 3C1E 抗体作为一种检测抗体通过 ELISA 系统对血清中 FGF-23 的浓度进行了测定。结果如图 19C 所示。

在这种肾功能障碍的疾病中病情发展情况通过尿中肌酐酞浓度
20 下降和血清中肌酐酞浓度升高而得以清楚体现。随着病情发展，演变成了血磷酸盐过高疾病。在该病例中，血液中 FGF-23 蛋白的浓度在一个显著的高水平值。这种病例被认为反映了肾功能衰竭的一种模式，表明了 FGF-23 可能是一种诱导肾功能下降和血液透析病人的某些并发症的因素。

25 实施例 26 利用免疫沉淀法检测存在于肿瘤诱导的骨软化症病人血浆中的 FGF-23 蛋白

为了检测 FGF-23 蛋白在血液中的存在状态，对正常受试者的血浆或肿瘤诱导的骨软化症病人的血浆通过免疫沉淀方法进行了检测。向 400 μ l 混合血浆样品中加入 20 μ l 已固定 2C3B 抗体的树脂(实施例
30 14 中制备)，或加入 20 μ l 未固定抗体的树脂。利用上下摇荡的方式将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 混合 1 小时以确保抗体同 FGF-23 进行反应。接下来，

- 利用 PBS 溶液洗涤树脂 4 次, 这样可除掉未反应的产物。50 μ l 样品缓冲液 (50mM 的 Tris-Cl 溶液, pH 为 6.8, 1% 的 SDS 溶液, 10% 的甘油溶液, 0.001% 的溴酚蓝溶液, 2mM 的乙二胺四乙酸(EDTA)溶液, 和 20mM 的 DTT 溶液) 加入进每一种类型的树脂中。将该溶液
- 5 在 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟后进行离心分离, 收集分离后的上清液。上清液利用浓度为 10% - 20% 的浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 然后利用一种半干印迹转移槽 (Owl Separation Systems, 美国) 将凝胶中的蛋白转移到一种聚偏氟乙稀膜 (美国 Millipore 公司) 上。然后, PVDF 膜在室温下用 T-TBS (美国 Sigma 公司) 溶液稀释后的生物素标记的 3C1E 抗体溶液 (稀释后的浓度为 0.5 μ g/ml) 中培育 2 小时。而且, 将 HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素 (DAKO, 丹麦) 同生成物进行反应。利用一种 ECL Plus 发光系统 (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 将混合溶液暴露于胶片上 1 小时, 然后胶片用一个自动处理器 (日本富士胶片公司) 进行处理。结果见图 20。
- 10 在未固定抗体的树脂中, 仅观察到了血浆产生的非特异性信号分子。然而, 利用 2C3B 抗体进行免疫沉淀得到的产物中, 检测到了一条分子量为 32 kDa 的带, 怀疑其代表了肿瘤诱导的骨软化症病人血浆中的全长 FGF-23。而且, 在用凝血酶切割的产物中未检测到 22 kDa 的条带。同时, 在正常受试者中, 22 kDa 的带和 32 kDa 的带均未检测到。
- 15 20 从这些结果中可以表明: 肿瘤诱导的骨软化症中高水平表达的 FGF-23 以未经切割的全长形式存在于血液中。

实施例 27 正常小鼠接种抗人 FGF-23 的单克隆抗体实验

- 为了检测抗人 FGF-23 的单克隆抗体对正常小鼠的影响, 进行了下列实验。正常小鼠 (BALB/c, 雄性, 12 周大) 被随机分成 5 组,
- 25 每组由 4 只小鼠组成。如图 21A 所示, 0.15ml 磷酸盐缓冲液作为载体通过臀静脉单一接种组 1 中的每只小鼠, 0.67mg/ml 抗人 FGF-23 的单克隆抗体 (1D6A 抗体, 2C3B 抗体, 和 3C1E 抗体) 通过臀静脉分别单一接种组 2, 3 和 4 中的每只小鼠, 0.67mg/ml 抗 TPO 的单克隆抗体作为对照通过臀静脉单一接种组 5 中的每只小鼠。接种 24 小时
- 30 后, 在乙醚麻醉的状态下从小鼠的心脏中采集血样, 然后利用一种微量采血管 (美国 Becton Dickinson 公司) 分离出血清。按照附件中的

方法利用一种磷 - 测试 Wako (日本和光纯药工业公司), 钙 - 测试 Wako(日本和光纯药工业公司), 和 1,25(OH)₂D RIA 试剂盒 TFB(TFB, 美国) 对这样采集到的血清中的磷酸盐浓度, 钙浓度和 1,25D 的浓度分别进行了测定。在接种至血样采集期间, 每组小鼠均被关在一只塑料笼中, 包含有 1%的磷和 1%的钙的 CE-2 固体饲料 (日本 CLEA 公司) 和自来水采取任意采食的方式进行饲喂。

测定结果如图 21A 所示。每组的测定值利用平均值 + / - 标准偏差来表示。标记有一个 “*” 号的组表明当通过 Student-t 法进行显著性测试时, 接种载体 (磷酸盐缓冲液) 的组和接种抗 TPO 抗体的组其 p 值均小于 0.01。

实施例 28

实施例 27 中, 在接种 3C1E 抗体的实验中尽管观察到了血清中磷浓度的升高, 但是同时也观察到了血清中 1,25D 浓度的降低。然而, 已知血液中 1,25D 的浓度是快速变化的, 1,25D 的这样一种特性, 使得当观察到其浓度暂时增大的时候, 稍后也能观察到其浓度的降低。因此, 重做一次接种 3C1E 抗体的实验。3C1E 抗体以 400μg/只的剂量通过静脉接种的方式给 6 只正常小鼠接种。接种 8 小时以后, 对血清中 1,25D 的浓度进行检测。作为一对照组, 对通过相似的接种方式接种 PBS 的小鼠血清中的 1,25D 浓度也进行了检测。结果如图 21B 所示。在该实验中, 观察到了由于接种 3C1E 抗体而引起了小鼠血清中 1,25D 浓度明显升高的现象。

实施例 29 抗 FGF-23 的抗体 (3C1E 抗体) 在患有腺嘌呤诱导的肾功能障碍的大鼠中恢复 1,25(OH)₂D 水平的作用

如实施例 25 所描述的那样, 产生这种疾病 (腺嘌呤诱导的肾功能障碍) 的第 3 周, 在大鼠的血清中观察到了磷浓度和血液中 FGF-23 浓度的显著升高。而且, 在这种疾病中, 在接种腺嘌呤之后第七天, 观察到了血液中 1,25D 浓度的下降 (肾功能也是下降的) (见图 22A)。因此, 为了比较和检测肾功能紊乱早期时血液中 FGF-23 的浓度, 按如下的方式对其进行了定量检测。

在 ELISA 化验中, 2C3B 抗体作为一种固定化抗体, 生物素标记的 3C1E 抗体作为检测抗体。首先, 利用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释

纯化后的 2C3B 抗体至 50 μ g/ml。50 μ l 的生成物溶液加入到 ELISA 系统 (Maxisorp(商标), Nunc, 美国) 中的 96 孔板中, 然后将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 培育 12 小时以使其固定在平板上。接下来, 除去反应溶液, 向每孔中加入 250 μ l 的阻滞溶液 (Superblock(商标), PIERCE, 美国), 5 然后在室温培育 30 分钟, 以阻滞反应的进行。除掉溶液以后, 每个孔用含有 0.1%吐温 20 的 TBS(T-PBS)溶液洗涤两次。血清样被制得, 并利用 T-TBS 溶液稀释 2 倍。除此之外, 标准产物用实施例 14 中制备的已经应用于固定抗 2C3B 抗体的树脂实验中的大鼠血清进行稀释, 目的是除去内生性 FGF-23, 然后再用 T-TBS 溶液稀释 2 倍。每一种样品取 50 μ l 加入进微量滴定盘的每个孔中, 然后在室温培育 1 10 小时, 这样可使分析物中的 FGF-23 蛋白与固定化抗体进行反应。经过抗体反应后, 利用 T-TBS 溶液洗涤孔 4 次, 然后向每个孔中加入稀释后的浓度为 1.5 μ g/ml 的 3C1E 抗体溶液 (稀释方法为利用一种含 10%阻滞溶液 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀 15 释 3C1E 抗体至 1.5 μ g/ml)。将该溶液在室温培育 30 分钟, 以使同生物素标记的抗体相结合。利用 T-TBS 溶液洗涤每个孔 4 次, 然后向每个孔中加入 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (DAKO, 丹麦), 是一种过氧化物生色底物, 在室温进行培育。30 分钟后, 向每一孔中加入 5 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液以停止反应。利用测量 96 孔板的光吸收值 20 的一种系统进行测定, 得到的值(A450-A570)为 450nm 下的光吸收值减去 570nm 下的光吸收值。基于标准曲线, 通过将获得的测定值转换为纯化后的人抗 FGF-23 蛋白的重组体的产物的指示浓度值对浓度进行测定。

结果如图 22B 所示, 在喂养混合了腺嘌呤的组中观察到了血液中 25 FGF-23 浓度的明显升高。如实施例 25 所示, 给正常小鼠接种 FGF-23 后能导致血液中 1,25D 浓度的快速下降, 表明当肾功能下降时, 血液中 1,25D 浓度的下降和血液中 FGF-23 浓度的增加之间存在某些联系。为了证实这种可能性, 将喂养混合了腺嘌呤的大鼠血液中的 1,25D 浓度和 FGF-23 浓度对单个大鼠作图。因此, 从图中可见二者之间有一 30 明显的负的线性相关性 (图 22C)。这些结果表明: 通过控制血液中 FGF-23 的浓度来校正 1,25D 浓度下降的方法具有可行性。因此,

按下述的方式进行了一个给这种模式的受试者接种中和抗 FGF-23 抗体的实验。

12 只 7 周大的雄性威斯塔氏鼠用适于啮齿动物的并混合了腺嘌呤[(6-氨基嘌呤, 美国 Sigma 公司), 腺嘌呤的最终浓度为 0.75%]的 CE-2 商业粉状饲料(日本 CLEA 公司)饲喂 7 天, 饲喂方式为任意采食的方式, 产生了肾功能下降疾病。给一对照组的 12 只小鼠只饲喂 CE-2(未混合腺嘌呤)。为了使在病发第七天肾功能紊乱的程度与使用一种血液肌氨酸水平相当, 每组用混合有腺嘌呤的饲料喂养的鼠与对照组中的鼠均应分别被分成 2 组(6 只/组), 然后通过臀静脉用 3C1E 抗体或磷酸盐缓冲液以 1mg/kg 的剂量单一接种。接种 12 小时后, 从臀动脉采集部分血样, 然后将血样进行离心分离, 这样获得血清。利用一种 1,25(OH)₂D RIA Kit TFB (TFB, 美国)对这样获得的血清中的 1,25D 浓度进行检测, 并且利用 CRE-EN Kainos((商标), KAINOS 实验室, Inc., 日本)对这样获得的血清中的肌酸酐浓度也进行了检测。

检测结果如图 22D 所示, 与只喂养载体(PBS)的每一组相比, 在所有的对照组和喂养混合了腺嘌呤的组中观察到了 1,25D 浓度的明显升高。上述结果表明 FGF-23 参与产生维生素 D 低下(一种血液中低水平的 1,25D 疾病)疾病, 并伴随肾功能下降, 此时抑制 FGF-23 的作用能够改善维生素 D 低下的状况。

实施例 30 对患有性连遗传型低磷酸盐血症佝偻病(XLH)的病人血液中 FGF-23 蛋白的测定

XLH 是一种低磷酸盐血症佝偻病的形式, 显示一种性连遗传型的遗传特性, 而且其发病率与肿瘤诱导的骨软化症具有许多相同点。近年来, 属于金属内肽酶家族的 *phex* 基因被认为是产生这种疾病的致病性基因, 并且一种假定的底物表明是诱导成病的一种因子。同时, 如实施例 23 所示, 在 Hyp 小鼠的血液中 FGF-23 的浓度极高, 这种小鼠是在 *phex* 基因中有一个基因发生变异(同 XLH 中的基因变异相同)的遗传性低磷酸盐血症的模式小鼠。这些现象表明对于患有 XLH 的病人的低磷酸盐血症, 同肿瘤诱导的骨软化症相似, 是由于血液中 FGF-23 浓度升高所导致的。因此, 首先, 为了检测 FGF-23 在该疾

病中所起的作用，对正常受试者和患有 XLH 的病人的血清中的 FGF-23 浓度进行了测定。除此之外，在获得充足的 phex 基因突变之前的正常受试者和被证实在 phex 基因中有变异基因的 XLH 病人之后，用于测定的血清才能大量提供。病人的年龄，性别，和 phex 基因中的变异点如图 23 所示。

在 ELISA 化验中，2C3B 抗体被作为一种固定化抗体，生物素标记的 3C1E 抗体被作为一种检测抗体。首先，利用 50mM 的碳酸氢钠溶液稀释纯化后的 2C3B 抗体至 10 μ g/ml。50 μ l 的生成物溶液加入到 ELISA 系统 (Maxisorp(商标), Nunc, 美国) 中的 96 孔板中，然后将该溶液在 4 $^{\circ}$ C 培育 12 小时以使其固定在平板上。接下来，除去反应溶液，向每孔中加入 250 μ l 的阻滞溶液 (Superblock(商标), PIERCE, 美国)，然后在室温培育 30 分钟，以阻滞反应的进行。除掉溶液以后，每个孔用含有 0.1%吐温 20 的 TBS(T-PBS)溶液洗涤两次。从 XLH 病人中采集的血清被制备成测试样，用含有一种在 100 μ g/ml 的浓度时不与 FGF-23 结合的包含有小鼠 IgG1 抗体的 T-TBS 溶液稀释 2 倍。此外，利用正常受试者的血清 (该血清利用一种在 100 μ g/ml 的浓度时不与 FGF-23 结合的包含有小鼠 IgG1 抗体的 T-TBS 溶液稀释了 2 倍) 对标准产物进行稀释 (利用向实施例 14 中制备的固定了抗 2C3B 抗体的树脂中加入血清除去内生性 FGF-23)。每一种样品取 50 μ l 加入进微量滴定盘的每个孔中，然后在室温培育 1 小时，这样可使分析物中的 FGF-23 蛋白与固定化抗体进行反应。经过抗体反应后，利用 T-TBS 溶液洗涤孔 4 次，然后向每个孔中加入稀释后的浓度为 1.5 μ g/ml 的 3C1E 抗体溶液 (稀释方法为利用一种含 10%阻滞溶液 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释 3C1E 抗体至 1.5 μ g/ml)。将该溶液在室温培育 30 分钟，以进行次级抗体反应。利用 T-TBS 溶液洗涤每个孔 4 次后，利用一种含 10%阻滞溶液 (Blockace(商标), 日本制药公司) 的 T-TBS 溶液稀释 HRP 标记的抗生物素蛋白链菌素 (DAKO, 丹麦) 至 5000 倍，取 50 μ l 稀释后的溶液加入进每一孔中。该溶液在室温培育 30 分钟，以使抗生物素蛋白链菌素同生物素标记的抗体相结合。利用 T-TBS 溶液洗涤每个孔 4 次，然后向每个孔中加入 50 μ l 的 N-四甲联苯胺 (DAKO, 丹麦)，是一种过氧化物生色

底物,在室温进行培育。30 分钟后,向每一孔中加入 50 μ l 浓度为 0.5M 的硫酸溶液以停止反应。利用测量 96 孔板的光吸收值的一种系统进行测定,得到的值(A450-A595)为 450nm 下的光吸收值减去 595nm 下的光吸收值。

- 5 结果,在 104 位正常成人中(30 男性和 74 位女性)中,血液中的 FGF-23 浓度聚集在 8.2-54.3ng/l 的范围内,并且平均值和标准偏差是 28.9 ± 1.1 ng/l。同时,如图 23 所示,所有患有 XLH 疾病的病人血清中的 FGF-23 浓度值均高于正常受试者的平均值。而且,即使是患有 XLH 疾病的病人血清中 FGF-23 的平均浓度值也明显高于
- 10 正常受试者的平均浓度值($p < 0.0001$, 利用 Student-t 计算得到的)。这些结果强烈地暗示 XLH 患者血清中高浓度的 FGF-23 作为诱发疾病的因子的可能性。

实施例 31 两种不同的中和抗体混合时增强中和活性的作用

- 当识别不同位点的中和抗体混合时,利用正常小鼠对其生理活性的变化进行了检测。
- 15

- 8 周大的 C57BL/6 雄性小鼠被随机分成 4 组,每组由 6 只小鼠组成。PBS 溶液作为载体通过臀静脉单一接种组 1 中的每只小鼠,100 μ g 的 2C3B 抗体通过臀静脉分别单一接种组 2 中的每只小鼠,100 μ g 的 3C1E 抗体通过臀静脉分别单一接种组 3 中的每只小鼠,100 μ g 的抗体混合物(50 μ g 的 2C3B 抗体和 50 μ g 的 3C1E 抗体)通过臀静脉分
- 20 别单一接种组 4 中的每只小鼠。接种后的第 1 天和第二天,在乙醚麻醉的状态下从眼眶中采集血样,利用一种微量采血管(美国 Becton Dickinson 公司)分离出血清。然后按照附件中的方法利用一种磷测试 Wako(日本和光纯药工业公司)对这样采集到的血清中的磷酸盐
- 25 浓度进行了测定。在接种至血样采集期间,每组小鼠均被关在一只塑料笼中,CE-2(日本 CLEA 公司)和自来水采取任意采食的方式进行饲养。

- 所得结果如图 24 所示。单独的 100 μ g 2C3B 抗体或 100 μ g 3C1E 抗体在接种后第一天就导致血清中磷浓度的显著增加。另一方面,在
- 30 接种抗体混合物的组中,虽然每种抗体的剂量均减半,但还是显示了血清中磷浓度的显著增加,而且与任何只接种一种抗体的组相比其血

清中的磷浓度都非常高。而且，在接种后的第二天，接种 2C3B 抗体或 3C1E 抗体的组中，提高血清中磷浓度的作用消失了，而接种抗体混合物的组中血清中磷浓度仍然急剧增加。上述结果表明与只接种一种类型的抗体病例相比，识别不同位点的 2 种类型的抗体混合物能够
5 进一步增强中和活性，并更长时间地维持这种作用。

实施例 32 给患有遗传性低血磷酸盐病的小鼠接种 FGF-23 中和抗体实验

如实施例 23 和实施例 30 所示，在 XLH 和 Hyp 小鼠中观察到了血液中 FGF-23 浓度的升高，表明 FGF-23 是一种对应低血磷酸盐病
10 （维生素 D 代谢异常，或骨钙化障碍都是这种疾病的发病原因）的因子。因此，给 Hyp 小鼠接种抗 FGF-23 中和单克隆抗体，然后对该抗体是否能改善上述病症进行了检测。

(1) 重复接种抗 FGF-23 中和抗体实验

利用 4-7 周大的 C57BL/6-Hyp 雄性小鼠和同一窝出生的野生型
15 C57BL/6 雄性小鼠，给 Hyp 小鼠重复接种中和抗体后对血液中磷浓度和 1,25D 浓度的影响进行了检测。本实验中的四组包括：一组接种载体的野生型小鼠，一组接种抗体的野生型小鼠，一组接种载体的 Hyp 小鼠，和一组接种抗体的 Hyp 小鼠。每组包括 4 只小鼠。在接种抗体的小鼠组实例中，具体的说，3C1E 抗体和 2C3B 抗体混合，它们的
20 的终浓度均为 1.7mg/ml，然后生成物（混合溶液）以 17mg/kg 的剂量通过皮下至脊背区间接种每只小鼠。在接种抗体的小鼠组中，具体的说，PBS 以 10mg/kg，同接种抗体的组相同体积的剂量接种该组中的每只小鼠。经过最初接种后的第 2，第 4 和第 6 天，截取小鼠的尾部末端，然后在乙醚麻醉的状态下采集部分血样。然后利用一种磷测试 Wako（商标，日本和光纯药工业公司），钙 - 测试 Wako（商标，
25 日本和光纯药工业公司），1,25(OH)₂D RIA Kit TFB（TFB，美国）和碱磷 B - 测试 Wako（商标，日本和光纯药工业公司）对这样采集到的血液中的磷酸盐浓度，钙浓度，1,25D 浓度和总碱性磷酸酶活性分别进行了测定。

30 结果如图 25A 所示。在接种抗体的野生型小鼠组中，在接种后的 1 至 7 天观察到了血清中的磷酸盐浓度明显的升高了。同接种载体的

Hyp 小鼠组,在接种后的 1 至 7 天观察到的血清中的磷酸盐浓度相比,观察到了接种抗体的 Hyp 小鼠组血清中的磷酸盐浓度明显的升高了。这些增高值在接种后的第 7 天变得更加明显,表明浓度可达到与接种野生型小鼠抗体相同程度的浓度值。而且,通过接种中和抗体,在接种后的第 1 天,在野生型小鼠和 Hyp 小鼠组中都观察到了血液中 1,25D 浓度的显著升高。同时,在 Hyp 小鼠或患有低磷酸盐血症佝偻病(例如 XLH)的病人中,其血液中总碱磷酸酶活性异常增高的现象已经有过报道。表明从接种后 24 小时开始,给 Hyp 小鼠接种的中和抗体逐渐减弱,血液中总的碱性磷酸酶活性水平比正常小鼠的活性水平异常的高,并且进一步导致了活性显著降低至与野生型小鼠初始接种后第七天时的程度相当的水平。

利用 4-7 周大的雄性 C57BL/6J-Hyp 小鼠组和同一窝出生的雄性野生型 C57BL/6J 小鼠组和正常小鼠作为对照组,给 Hyp 小鼠重复接种抗 FGF-23 中和抗体后对骨组织的影响进行了检测。本实验中的四组包括:一组接种载体的野生型小鼠,一组接种抗体的野生型小鼠,一组接种载体的 Hyp 小鼠,和一组接种抗体的 Hyp 小鼠。每组包括 4 只小鼠。在接种抗体的小鼠组实例中,具体的说,3C1E 抗体和 2C3B 抗体混合,它们的终浓度均为 1.7mg/ml,然后生成物(混合溶液)以 17mg/kg 的剂量通过皮下至脊背区间接种每只小鼠。在接种载体的组中,具体的说,PBS 以 10mg/kg 的剂量通过皮下至脊背区间接种该组中的每只小鼠。最初接种的时间被定为是第 0 天,那么在第 2 天,第 4 天,第 6 天,第 8 天,第 21 天和第 40 天时,进行相同的接种。在最初接种后的第 49 天,在乙醚麻醉的状态下从心脏中采集部分血样,和右股骨样,右胫骨样,和肋样。利用一种 μ F FX-1000 微焦 X-射线放大影像系统(日本富士胶片公司)在电流为 100 μ A,电压为 25kV 的输出条件下辐射 5 秒,然后利用一种 BAS 影像分析仪(日本富士胶片公司)数字化后,得到所截取的股骨,胫骨和肋骨的放大的 X-射线影像。

这样所获得的提取后的股骨,胫骨,和肋骨的放大 X-射线影像如图 27 所示。在 Hyp 小鼠或像低磷酸盐血症佝偻病(例如 XLH 疾病)这样的病例中,对于钙化紊乱,长骨的干骨后端或肋肋的软骨

关节处的增大现象相关联的软骨细胞增加的现象已有过报道。作为 X 射线影像分析的结果, 在存在干骨后端增长现象的 Hyp 小鼠组中, 发现接种抗体后病情得到缓解, 而在接种载体的组中发现骨密度下降, 腿节和胫骨的皮质骨变薄。而且, 在接种抗体的 Hyp 小鼠组中
5 发现病情得到缓和, 而在接种载体的 Hyp 小鼠组中发现腿节和胫骨不能纵向增长。接种载体的 Hyp 小鼠组中肋脉关节和肋的软骨增大, 而这些现象在接种抗体的 Hyp 小鼠组中消失。表明给 Hyp 小鼠重复接种抗 FGF-23 的中和抗体可改善骨延伸紊乱和骨钙化紊乱。

而且, 为了详细检测抗 FGF-23 抗体对骨组织的作用, 从进行本
10 实验的动物中制得了骨组织样品。实验后的动物经宰杀后, 左胫骨和右股骨被提取出来, 将其加入进 70 % 的乙醇中, 进行 Villanueva Bone(Villanueva Bone Stain Powder, MARUTO INSTRUMENT CO., LTD., 日本) 染色, 利用浓度连续升高的乙醇溶液对骨进行脱水, 然后包埋进 Technovit 7100(德国 Kulzer 公司) 中。生成物切成大约 5 μ m
15 厚的薄片, 然后将胫骨的近端部分和股骨的远端部分在显微镜下进行观察。骨组织样品的影像如图 28 所示。在野生型小鼠中观察到了软骨细胞中的生长片以有序的方式进行排列(图 28A 和 D), 在 Hyp 小鼠的骨组织中, 观察到了有一被干扰的柱结构区域, 其特征为具有生长片的扩大区域和软骨细胞的不规则序列(图 28B 和 E)。相反,
20 对于进行重复接种抗 FGF-23 中和抗体的 Hyp 小鼠中, 观察到了生长片宽度的增加得到了抑制和软骨细胞的不规则序列消失的现象(图 28C 和 F)。

(2) 单一接种抗 FGF-23 中和抗体的实验

利用 12 - 20 周大的雄性 C57BL/6-Hyp 小鼠和同一窝出生的野生
25 型雄性 C57BL/6J 小鼠, 给 Hyp 小鼠单一接种抗 FGF-23 中和抗体后对血液中磷酸盐浓度和 1,25D 浓度的影响进行了检测。本实验中的四组包括: 一组接种载体的野生型小鼠(n = 4), 一组接种抗体的野生型小鼠(n = 5), 一组接种载体的 Hyp 小鼠(n = 3), 和一组接种抗体的 Hyp 小鼠(n = 3)。在接种抗体的小鼠组实例中, 具体的说, 3C1E 抗体和 2C3B
30 抗体混合, 它们的终浓度均为 1.7mg/ml, 然后生成物(混合溶液)以 17mg/kg 的剂量通过皮下至脊背区间接种每只小鼠。在接种载体

的小鼠组中，具体的说，PBS 以 10mg/kg 的剂量接种该组中的每只小鼠。接种后的第 4 天，在乙醚麻醉的状态下从小鼠中提取出来的心脏和肾脏中采集血样。

对这样获得的血清中的磷酸盐和 1,25D 的浓度进行测定，结果如图 25B 所示。通过给野生型小鼠单一接种这种抗体，血清中磷酸盐浓度和 1,25D 的浓度在接种后的第 4 天均表现了明显的升高。在 Hyp 小鼠中也观察到了浓度升高的这种效应。通过接种抗体，血清中磷酸盐的浓度被从低水平值校正到了高水平值，并且 1,25D 的浓度显著增大。

10 (3) 抗 FGF-23 中和抗体控制 NaPi2a 和 1 α OHase 的表达的作用

利用倚赖钠的磷酸盐协同运输效应 (NaPi2a 该效应主要出现在肾小管中) 通过重吸收率对血清中磷酸盐浓度进行了测定。而且，已经有对重吸收率被倚赖 NaPi2a 自身的表达水平或 NaPi2a 蛋白的定位率所控制的报道。因此，对抗 FGF-23 中和抗体是否有通过 NaPi2a 的调控来提高血清中磷酸盐浓度的效应进行了检测。

利用一种冻融的肾脏，按照 Katai 等人在生物化学杂志 (1999 年，274 卷，28845 - 28848 页) 上报道的一种钙沉淀方法制备了固定有 NaPi2a 的肾近位尿细管刷状缘膜囊(BBMV)。按照实施例 16 中描述的 Western 印迹法对每一种的得到的 BBMV 膜 20 μ g 进行测定。利用从抗血清[利用和实例 5 相似的方法通过免疫兔子而得到抗血清，该抗血清具有小鼠的 NaPi2a 蛋白中的 C-末端肽片段(SEQ ID NO: 32)]中纯化得到的抗鼠 NaPi2a 的兔多克隆抗体对 NaPi2a 蛋白进行了测定。结果如图 25C 所示。已经有过报道表明 NaPi2a 蛋白水平在 Hyp 小鼠的 BBMV 中被显著降低了。然而，通过接种抗 FGF-23 中和抗体，NaPi2a 的表达被显著提高了。

在野生型小鼠中，也进一步观察到了 NaPi2a 蛋白浓度的升高。而且，利用上述的 BBMV 对 NaPi2a 蛋白调控的磷酸盐转移活性进行了检测。利用从每一个体制备的每一种 BBMV 0.1mg，通过一种快速过滤方法对 60 秒内的倚赖钠的磷酸盐摄取活性进行了检测。反应物和反应条件按照 Katai 等人在生物化学杂志 (1999 年，274 卷，28845 - 28848 页) 上的报道进行

结果如图 25C 所示,对野生型小鼠和 Hyp 小鼠,由于接种了抗 FGF-23 中和抗体,导致了磷酸盐转移活性的升高。这些结果表明:通过给野生型小鼠和 Hyp 小鼠接种抗 FGF-23 中和抗体后血清中磷酸盐浓度升高的效应是由于存在于肾小管中的 NaPi2a 蛋白的水平值升高所导致的。

mNpt2C: LALPAHHNATRLC (SEQ ID NO: 32)

下一步,为了阐明提高血清中 1,25D 浓度的作用机理,对肾 25-羟维生素 D-羟化酶(1 α OHase)的表达模式进行了分析。利用一种 ISOGEN 试剂(NIPPON GENE CO., LTD., 日本)从一冷冻的肾中将总 RNA 提取出来。取 20 μ g 所得到的每一种 RNA 按照标准方法利用北方印迹法对其进行了检测。一种 PerfectHyb 试剂(日本 Toyobo 公司)用于进行杂交,杂交点的反应和洗涤按照附件中所述的方法进行。通过 PCR 方法扩增小鼠的 1 α OHase 部分 cDNA 而制得这里所用的探针,该 PCR 反应利用从小鼠肾脏中制备的 cDNA 文库作为模板,SEQ ID NOS: 33 和 34 所示的寡核苷酸作为引物,或者通过 PCR 扩增一个 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的部分 cDNA 作为一种内部标准,利用 SEQ ID NOS: 35 和 36 所示的寡核苷酸作为引物,通过一种 Meagaprim DNA 标记系统(美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司)利用 ³²P 标记 cDNA。利用一种 BAS 影像分析仪(日本富士胶片公司)对信号进行了检测。结果如图 25D 所示。证实了在野生型小鼠和 Hyp 小鼠中通过接种中和抗体,1 α OHase 的表达显著提高了。这些结果表明:抗 FGF-23 中和抗体在提高野生型小鼠和 Hyp 小鼠血清中 1,25D 浓度的作用是由于存在于肾中的 1 α OHase 的基因表达水平值的提高。

m1alphaFW: cagacagagacatccgtgtag (SEQ ID NO: 33)

m1alphaRV: ccacatggtccaggttcagtc (SEQ ID NO: 34)

gapdhFW: accacagtccatgccatcac (SEQ ID NO: 35)

gapdhRV: tccaccaccctgttgctgta (SEQ ID NO: 36)

上述结果表明 FGF-23 在降低 Hyp 小鼠血液中的磷酸盐浓度和 1,25D 浓度中发挥了非常重要的作用,换句话说,对于患有 XLH 的病人,通过接种抗 FGF-23 中和抗体可以抑制 FGF-23 作用的发挥,因此就能改善发病症状。而且,伴随着骨增长障碍和骨钙化障碍的 Hyp

小鼠血液中总碱磷活性异常高的水平值这一现象，通过接种 FGF-23 中和抗体也能使其值正常化。因此，该方法对治愈骨软化症并使骨重塑过程正常化是有疗效的。

实施例 33 抗 FGF-23 抗体(3C1E)对骨重塑的作用

- 5 如实施例 32(1)所描述的那样，表明了抗 FGF-23 抗体在骨重塑过程中的作用。为了进一步检测该结果，对经过接种抗 FGF-23 抗体后血清中骨钙素浓度随时间的变化进行了分析。该实验按如下程序进行：

3C1E 抗体以 3mg/kg 的剂量，或者是载体(PBS 溶液)以 1.1mg/kg
10 的剂量通过臀静脉给 7 周大的雄性 S.D.大鼠进行单一接种。在接种后的 4, 12, 24, 48, 和 72 小时，从臀动脉中采集部分血样，然后制得血清样。利用一种骨钙素 ELISA 试剂盒(日本 Amersham 生物科学公司)对血清中骨钙素的浓度进行了检测。结果如图 26 所示。在接种抗体后的 12, 24, 48 小时后，观察到了血清中骨钙素浓度的显著
15 升高。这些结果表明该种可能性，即接种的抗 FGF-23 抗体在骨重塑过程中有一种直接的或间接的影响。

实施例 34 抗 FGF-23 中和抗体(2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混合物)对骨质疏松症小鼠的作用

- 为了进一步检测如实施例 33 中所描述的抗 FGF-23 中和抗体在骨
20 代谢过程中的作用，在绝经后的骨质疏松症受试者中对抗 FGF-23 抗体在卵巢切除后骨量降低模型小鼠(被认为其可反映骨量减少)中的作用进行了检测。将 8 周大的 ddy 小鼠中的卵巢提取出来后，将小鼠分成 2 组：一组接种载体，另一组接种抗 FGF-23 抗体。此外，作为一手术对照组，对一组小鼠进行了假切除手术。对于接种抗体的组(n
25 = 10)，接种在手术后 3 天开始，抗体通过混合两种体积相同的 2C3B 抗体和 3C1E 抗体(2C3B 抗体和 3C1E 抗体的接种剂量同为 1.5mg/kg，接种总剂量为 3mg/kg)而制得，将该混合抗体通过皮下至脊背区域给小鼠进行接种，一周 3 次，连续接种 4 周。而且，对于接种载体的组(n = 9)和进行了假切除的对照组(n = 10)，将载体溶液以和抗体溶液
30 相同的剂量(10ml/kg)给小鼠进行接种。卵巢切除的第 2 周，在乙醚麻醉的状态下从小鼠眼眶中采集血样，卵巢切除的第 4 周，在乙醚麻醉

的状态下从小鼠心脏中采集血样。通过离心分离（在 8000 转/分钟的转速下离心分离 10 分钟）从采集的血样中制得血清，然后对血清中骨钙素的浓度（IRMA 试剂盒，Immutopics，日本）进行测定。卵巢切除后的第四周，从由于采集血样而宰杀掉的小鼠中提取股骨，然后

5 对骨中矿物质含量和骨密度（骨密度计，DCS-600 型，ALOKA CO., LTD.）进行了测定。

如图 29A 和 B 所示，同接种载体的组相比，卵巢切除后的第 2 周和第 4 周在接种抗 FGF-23 抗体（2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混合物）的组中都观察到了血清中骨钙素水平的明显升高。骨钙素是由造骨细胞特定产生的一种蛋白。由于体内血清中骨钙素的水平升高被认为是骨生成的一种指示剂，因此表明了该种可能性，即通过接种抗 FGF-23

10 抗体可促进骨的生成。

而且，如图 30A 和 B 所示，同进行了卵巢假切除并接种了载体的组相比，进行了卵巢切除并接种了载体的组表现出了骨量的显著减少。通过与卵巢切除后骨矿物质含量和骨矿物质密度明显下降相对

15 比，实行了卵巢切除并接种了抗 FGF-23 抗体的组表现出了异常高的骨矿物质含量和骨矿物质密度的水平值。基于这些结果，我们认为接种抗 FGF-23 抗体可抑制由于卵巢切除后所导致的骨量减少。

实施例 35 给患有遗传性低磷酸盐血症佝偻病的小鼠接种抗 FGF-23 中和抗体（2C3B 抗体和 3C1E 抗体的混合物）实验

20

如实施例 32 所示，表明了抗 FGF-23 的中和抗体可改善 Hyp 小鼠的骨增殖紊乱和骨钙化紊乱。因此，利用 4 周大的雄性 C57BL/6-Hyp 小鼠和同一窝出生的野生型 C57BL/6 小鼠（该野生型小鼠比例 32 中所用的小鼠在周年龄上小，这样生长更明显）对抗

25 FGF-23 中和抗体在改善 Hyp 小鼠的骨增殖紊乱和骨钙化紊乱疾病中所起的作用进行了详细检测。本实验中的四组包括：一组接种载体（PBS）的野生型小鼠，一组接种载体（PBS）的 Hyp 小鼠，一组接种低剂量抗体的 Hyp 小鼠，和一组接种高剂量抗体的 Hyp 小鼠。每组包括 6-7 只小鼠。中和抗体是由相同浓度的 2C3B 抗体和 3C1E 抗体

30 相互混合而制得的。对低剂量组，这样制得的中和抗体溶液中两种类型抗体的总量为 4mg/kg，对高剂量组，这样制得的中和抗体溶液中

两种类型抗体的总量为 16mg/kg。中和抗体或载体以 10ml/kg 的剂量通过皮下至脊背区域接种每只小鼠，将最初接种的时间定为第 0 天，那么在第 7 天，第 14 天，第 21 天，和第 28 天时，对小鼠进行重复接种。第 7 天，第 14 天，第 21 天，和第 28 天进行重复接种时对小

5 小鼠的体重，尾巴的长度，和胫骨的 *thel* 长度进行了测量。而且，最初接种后的第 31 天，在乙醚麻醉的状态下从小鼠心脏中采集血样，小鼠也被宰杀，然后提取左右的股骨和胫骨。

(1) 抗 FGF-23 中和抗体对增长尾巴长度，胫骨长度和增大体重的作用

10 Hyp 小鼠的骨头提供了佝偻病骨的表型（伴随着骨发育不全的特征，例如长骨在径向方向的增长障碍）。对于单个的小鼠，同野生型的小鼠相比，Hyp 小鼠在体长方面明显小，体重方面明显轻。为了检测抗 FGF-23 中和抗体对 Hyp 小鼠中像骨发育不全这样的疾病的作用，进行了对本实验中所用 Hyp 小鼠的尾部长度的，胫骨长度和体重

15 变化的测定。结果如图 31A, B 和 C 所示。也在本实验中，同正常小鼠相比，Hyp 小鼠尾巴和胫骨的增长程度明显低，体重明显轻。而且，同接种载体的 Hyp 小鼠组相比，接种了中和抗体的 Hyp 小鼠，中和抗体尽其最大作用使 Hyp 小鼠的尾部长度和胫骨长度得到了最大程度的增长，并且在增加体重方面是一种倚赖接种剂量的方式。

20 (2) 抗 FGF-23 中和抗体对骨钙化的作用

同正常的小鼠相比，已知 Hyp 小鼠的骨组织中未钙化和低钙化骨的比例是高的，但是在矿物质含量方面是低的。因此，对抗 FGF-23 中和抗体能否提高 Hyp 小鼠股骨中矿物质的含量进行了测定。在该实验中，提取后的左股骨在 100℃ 的干燥器中干燥 12 小时，然后称

25 重，得到干燥后骨的重量。接下来，将干燥后的骨在 600℃ 的马弗炉中焚烧 12 小时。对生成物称重以得到骨灰的重量。结果如图 32 所示。同野生型小鼠相比，在 Hyp 小鼠中，骨灰重量在干骨重量中所占的比例非常低。在接种了抗体的 Hyp 小鼠组中，骨灰重量在干骨重量中所占的比例表现出了明显增加（以一种随重复接种的中和抗体的剂量增加而增加的方式）。尤其是，在接种了高剂量抗体的组中，其骨

30 灰重量在干骨重量中所占的比例表现出了同野生型小鼠组所示的同一

水平值。

这些结果表明通过接种抗 FGF-23 中和抗体可抑制 FGF-23 的作用，因此能够改善如 Hyp 小鼠所示的骨增长障碍和骨钙化疾病。

5 实施例 36 利用 2C5L 抗体通过夹心式 ELISA 方法定量测定人的 FGF-23 蛋白

按照实施例 3 中的方法得到 2C5L 克隆杂交瘤，按照实施例 4 中的纯化方法对其进行纯化后得到 2C5L 抗体。通过实施例 10 中所述的方法对其识别位点的分析表明：同 2C3B 抗体的形式一样，2C5L 抗体在 N-末端多肽片段（该多肽片段相当于 SEQ ID NO:1 的介于第 25 位和第 179 位氨基酸残基之间的一段区域）内有一个识别位点，并且和 N-末端多肽片段和一种全长 FGF-23 蛋白形成了一种免疫复合体。而且，如实施例 12 所描述的一种方法，对一种利用 2C5L 抗体和 2C3B 抗体的一种重组体的夹心式 ELISA 方法的建立做了尝试。利用每一种抗体都可和 FGF-23 蛋白相结合的事实，表明这两种抗体之间并不存在彼此竞争性抑制的现象。根据这一结论，2C5L 抗体在 N-末端多肽片段（该多肽片段相当于 SEQ ID NO:1 的介于第 25 位和第 179 位氨基酸之间的一段区域）内有一个识别位点，但该识别位点不同于 2C3B 抗体的也位于 N-末端多肽片段内的识别位点。这表明利用一种两种类型抗体作为重组体的 ELISA 方法是可行的。接下来，当生物素标记的 3C1E 抗体作为检测抗体，并且 2C3B 抗体或 2C5L 抗体作为固定化抗体时，对利用实施例 13 中所描述的方法测定 FGF-23 蛋白的能力进行了检测。结果如图 33 所示。证实了 2C5L 抗体，在 10pg/ml 至 10ng/ml 的浓度范围内，以一种浓度倚赖型的方式可识别纯化后的人类 FGF-23 蛋白的重组体。

25 实施例 37 2C5L 抗体和小鼠 FGF-23 的交叉反应活性

如实施例 22 和 23 所示的利用 2C3B 抗体和 3C1E 抗体的一种重组体的夹心式 ELISA 系统中，同人的 FGF-23 相似，小鼠的 FGF-23 也能被识别出来。因此，对 2C5L 抗体是否能够识别小鼠的 FGF-23 做了检测。同实施例 24 类似，在血液中具有高水平值的 FGF-23 的小鼠血清制得后，利用 2C3B 抗体和生物素标记的 3C1E 抗体的一种重组体对其进行了检测，因此得到了一种浓度值显示为大约 600pg/ml

的一种样品。对于该样品，利用 2C3B 抗体和生物素标记的 3C1E 抗体的一种重组体通过夹心式 ELISA 系统对其进行了检测。然而，没有观察到反应活性。该结果表明 2C5L 抗体与人的 FGF-23 有强的结合能力，但是与小鼠的 FGF-23 有非常弱的结合能力或根本就没有结合能力。

实施例 38 2C5L 抗体对人的 FGF-23 中和活性的能力测定

实施例 37 的结果表明：由于同 2C3B 抗体或 3C1E 抗体与小鼠的 FGF-23 的结合能力相比，2C5L 抗体的结合能力显得非常低，因此 2C5L 抗体对小鼠内生性 FGF-23 的中和活性的能力也将不明显。然而，根据实施例 36 所示的结果，由于 2C5L 抗体与人的 FGF-23 有强的结合能力，2C5L 抗体对于人的内生性 FGF-23 可能有中和活性的能力。为了证实该能力，按照如下程序利用动物通过一种检测系统对 2C5L 抗体中和人的 FGF-23 的活性做了测定，然后利用该系统对 2C5L 抗体对人的内生性 FGF-23 的中和活性做了检测。

一种被调节后的以 1.2 μ g/天的剂量逐渐释放人的 FGF-23 重组体的微型渗透泵（alzet 微型渗透泵型号 1007D，加拿大）通过皮下至脊背区域移植进 7 周大的雄性 C57BL/6 小鼠体内，这样就构建了一种人的 FGF-23 重组体能连续接种的模式。在移植泵后的第 3 天，给小鼠通过腹腔接种一种包含 2C5L 抗体的抗 FGF-23 中和抗体或一种载体，然后对连续存在的人的 FGF-23 重组体降低血清中磷酸盐浓度的作用是否被接种后的抗体抑制而进行了检测。本实验中的四组包括：一组（未处理/载体）接种载体的未处理过的小鼠，一组（FGF-23/载体）接种载体的人类 FGF-23 重组体连续接种模式的小鼠，一组（FGF-23/2C5L）接种 2C5L 抗体的人类 FGF-23 重组体连续接种模式的小鼠，和一组（FGF-23/2C3B）接种 2C5L 抗体的人类 FGF-23 重组体连续接种模式的小鼠。PBS 作为载体并用于稀释抗体。抗 FGF-23 中和抗体以一种 20mg/kg 的剂量进行接种。载体和中和抗体以每 10g 体重接种 0.1mL 的剂量进行接种。在抗体接种前和抗体接种后，在乙醚麻醉的状态下从小鼠眼眶中采集血样以获得血清样。利用一种磷测试 Wako（商标），日本和光纯药工业公司）对血清中磷酸盐浓度进行检测。

结果如下。利用该微型渗透泵通过连续接种人的 FGF-23 重组体，在移植进泵后的第 3 天，同接种载体的未处理过的小鼠组相比，血液中磷酸盐的浓度出现了明显升高（图 34，左）。同 FGF-23/载体接种组或抗体接种前相比，当给一组人类 FGF-23 重组体连续接种模式的小鼠组(FGF-23/2C5L)接种 2C5L 抗体时，24 小时后，重组体降低血清中磷酸盐浓度的作用被抗体明显抑制了。血清中磷酸盐的浓度被提高到了同未处理过的/载体接种组相同的程度（图 34，右）。根据上述结果和实施例 37 中的结论，清楚的表明：2C5L 抗体具有抵抗倚赖连续的接种人类 FGF-23 重组体而导致血液中磷酸盐浓度下降的作用的中和活性。另一方面，对于接种 2C3B 抗体的组，24 小时后，血清中磷的浓度比未处理过的/载体接种组的磷浓度值明显高。该结果可能由于以下事实：具有与小鼠的 FGF-23 有强的结合能力的 2C3B 抗体不但对接种人的 FGF-23 重组体有中和活性，而且对内生性的小鼠 FGF-23 也有中和活性。

15 工业应用

依照本发明，提供了抗 FGF-23 的抗体。本发明中的抗体在通过适当地在体内进行测定和检测 FGF-23 而诊断伴随 FGF-23 蛋白的累积或下降的疾病或病理状况中非常有效。而且，本发明的抗体具有中和 FGF-23 作用的活性，因此能够通过抑制 FGF-23 的作用治疗或改善由 FGF-23 的过量作用所导致的疾病或病理状况。

将这里引用的出版物，专利和专利申请引入本申请作为参考。未背离本发明技术精神或范畴的一些改变和变化对本领域的专业人员来说显而易见。本发明包含这样的变化和修正。

25

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> 抗FGF-23抗体

<130> PH-1707-PCT

<140>

<141>

<150>JP2001/401689

<151>2001-12-28

<150>JP2002/262020

<151>2002-09-06

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 251

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val

1

5

10

15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
 20 25 30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
 50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
 65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
 85 90 95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn
 100 105 110

Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His
 115 120 125

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala
 130 135 140

Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
 145 150 155 160

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg
 165 170 175

His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val
 180 185 190

Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln
 195 200 205

Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu
 210 215 220

Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
 245 250

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 2

ccggaattca gccactcaga gcagggcacg 30

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 3

ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatggt gatgatggat gaacttggcg aa 52

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 4

ataagaatgc ggccgctcag atgaacttgg cgaa 34

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 5

ataccacggc agcacaccca gagcgccgag 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 6

ctcggcgctc tgggtgtgct gccgtggtat

30

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 7

atgaattcca ccatgttggg ggcccgcctc agg

33

<210> 8

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 8

atgcggcgcg ctaatgatga tgatgatgat ggatgaactt ggcgaaggg 49

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 9

Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Cys

1

5

10

15

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 10

Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly

1

5

10

15

Ala Pro His Gln Cys

20

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 11

Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser

1

5

10

15

Pro Gln Tyr His Cys

20

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 12

Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu

1

5

10

15

Cys

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 13

Cys Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg

1

5

10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 14

Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Cys

1

5

10

15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 15

Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Cys

1

5

10

15

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 16

Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Cys

1

5

10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 17

Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

1

5

10

15

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 18

Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Cys

1

5

10

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 19

Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val

1

5

10

15

Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys

20

25

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 20

Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu

1

5

10

15

Asn Cys

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 21

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala

1

5

10

15

Phe Leu Pro Gly Met Asn Cys

20

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 22

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Cys

1

5

10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 23

Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser

1

5

10

15

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 24

Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala

1

5

10

15

Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys

20

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 25

attagccact cagtgtgtg caatg

25

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 26

gcagcctggc ctggggacct a

21

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 27

ggaattccac catgctaggg acctgcctta gactc

35

<210> 28

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 28

atagtttagc ggccgcctag acgaacctgg gaaaggggog aca

43

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 29

ttcgcccacg gcaacacacg caaagcgccg aggac

35

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 30

gtcctcggcg ctttgcgtgt gttgccgtgg gcgaa

35

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

Arg His Thr Arg

1

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 32

Leu Ala Leu Pro Ala His His Asn Ala Thr Arg Leu Cys

1

5

10

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 33

cagacagaga catccgtgta g

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 34

ccacatgggc caggttcagt c

21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 35

accacagtcc atgccatcac

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

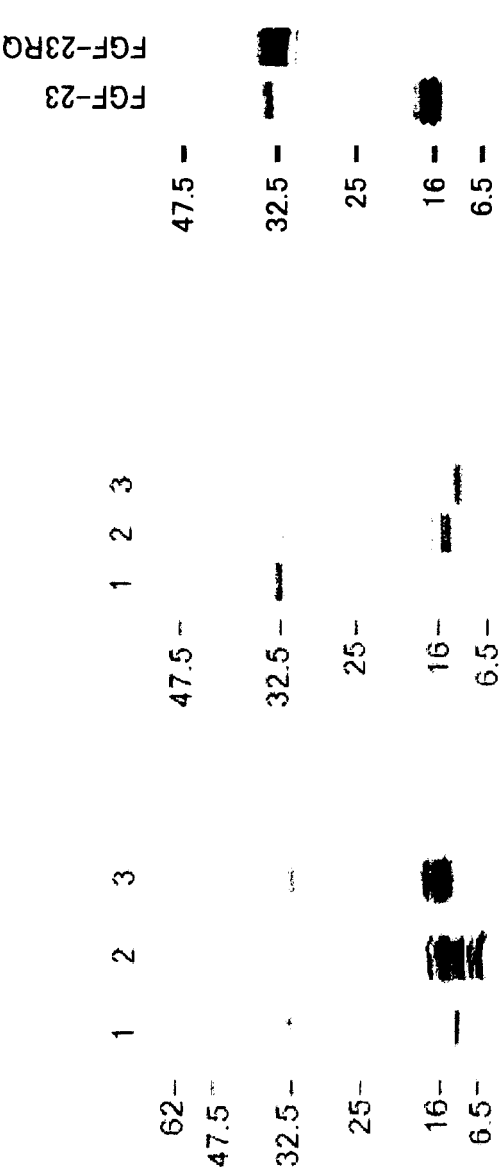
<220>

<223> 人工序列的描述：合成DNA

<400> 36

tccaccaccc tgttgctgta

20



1: Anti-His-tag 抗体
2: Anti-FGF23-48 抗体
3: Anti-FGF23-148 抗体

1: 全长 FGF-23
2: FGF-23 片段
(N-末端侧)
3: FGF-23 片段
(C-末端侧)

图 1A

图 1B

图 1C

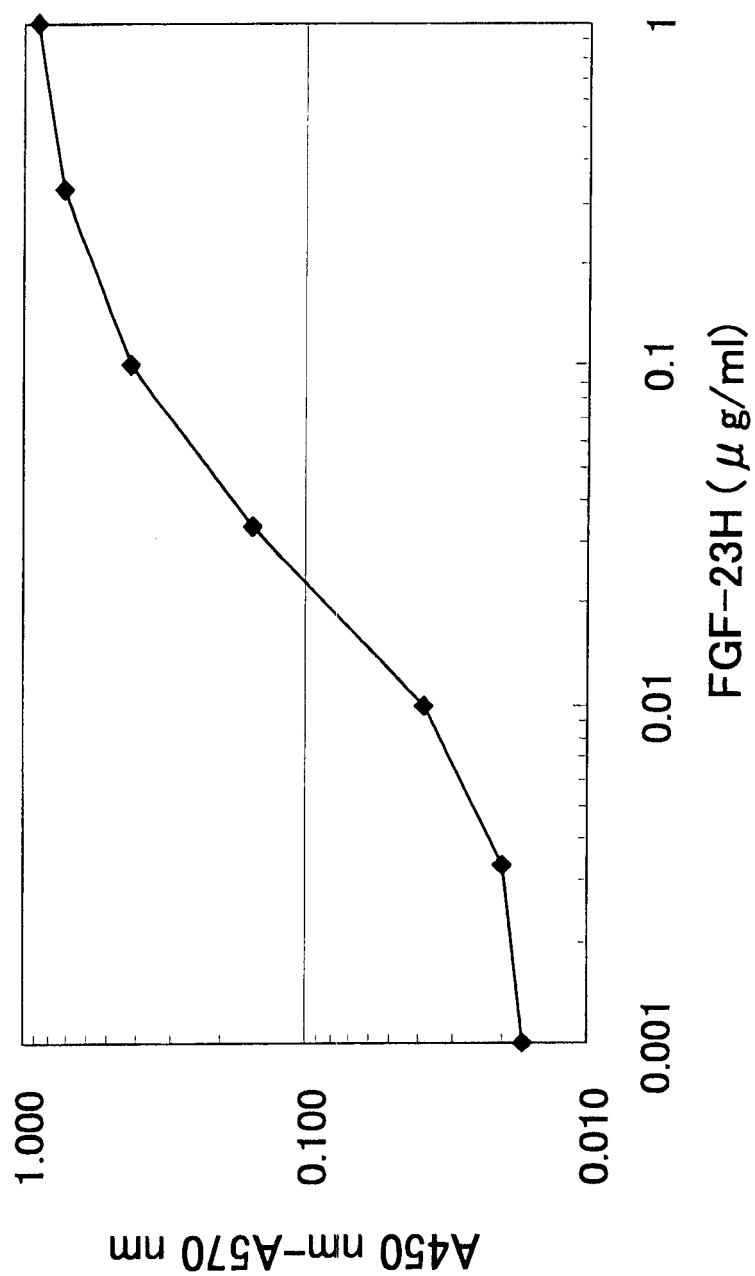
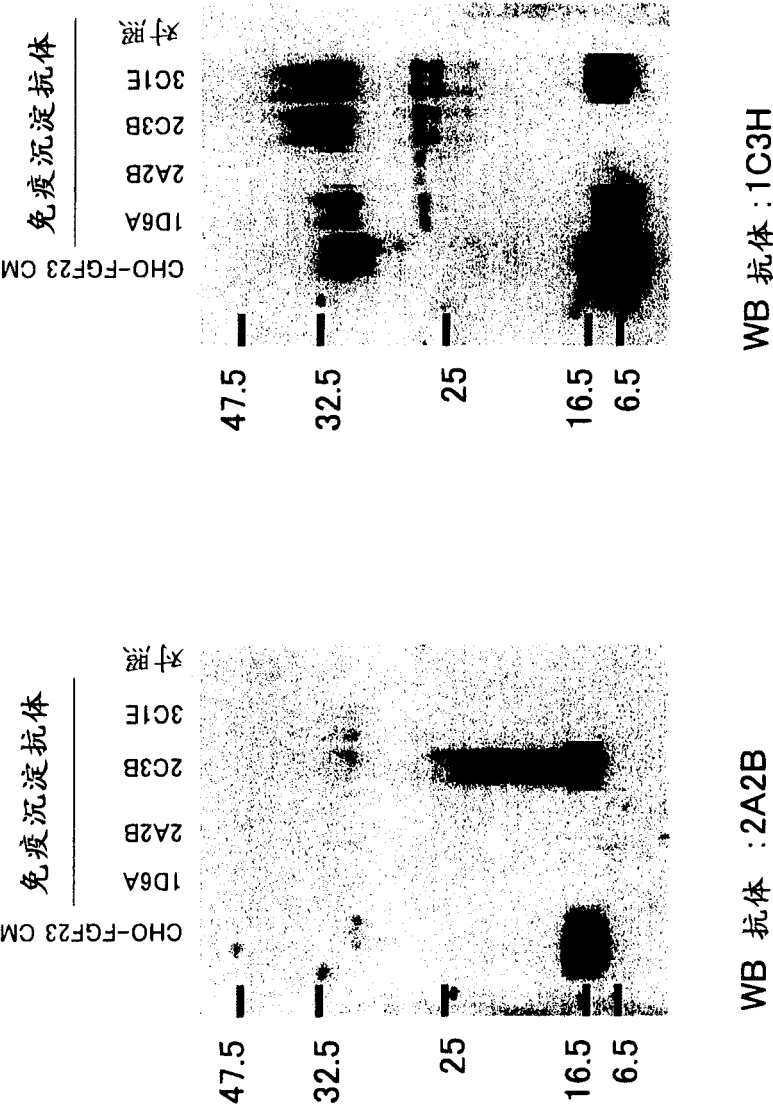
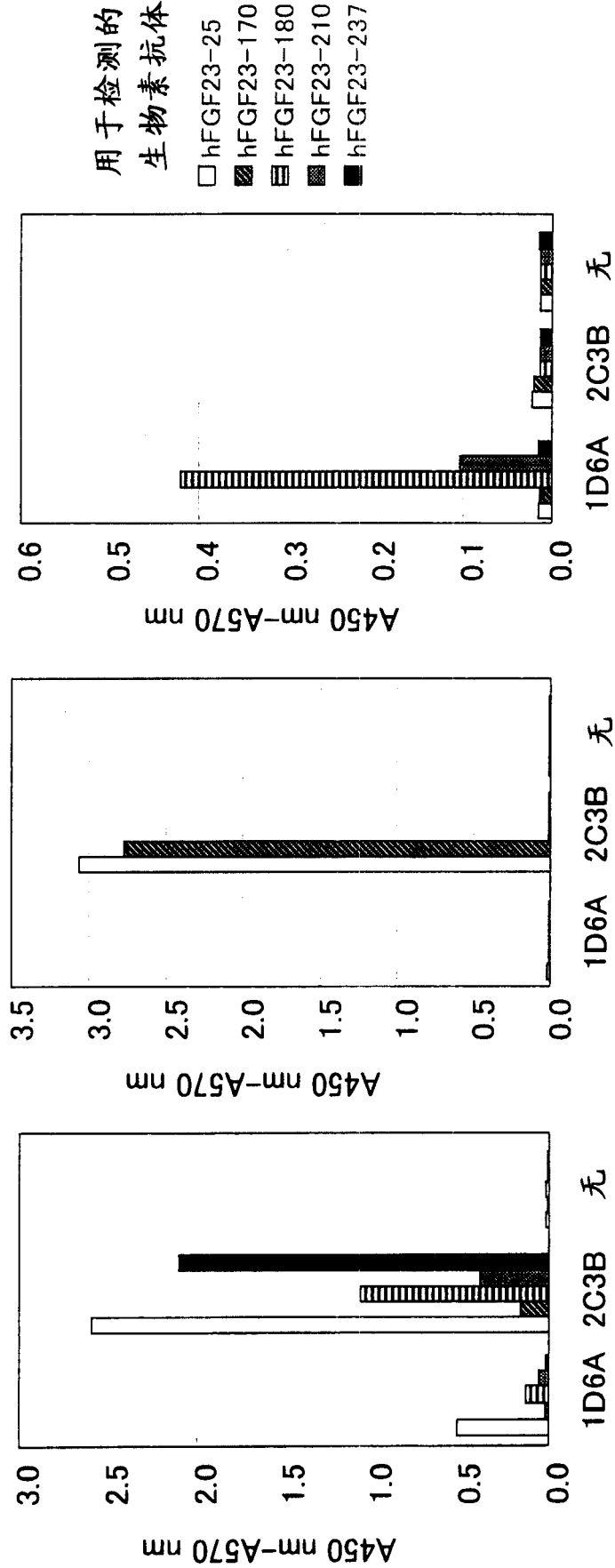


图 2





固定化单克隆抗体

图 4

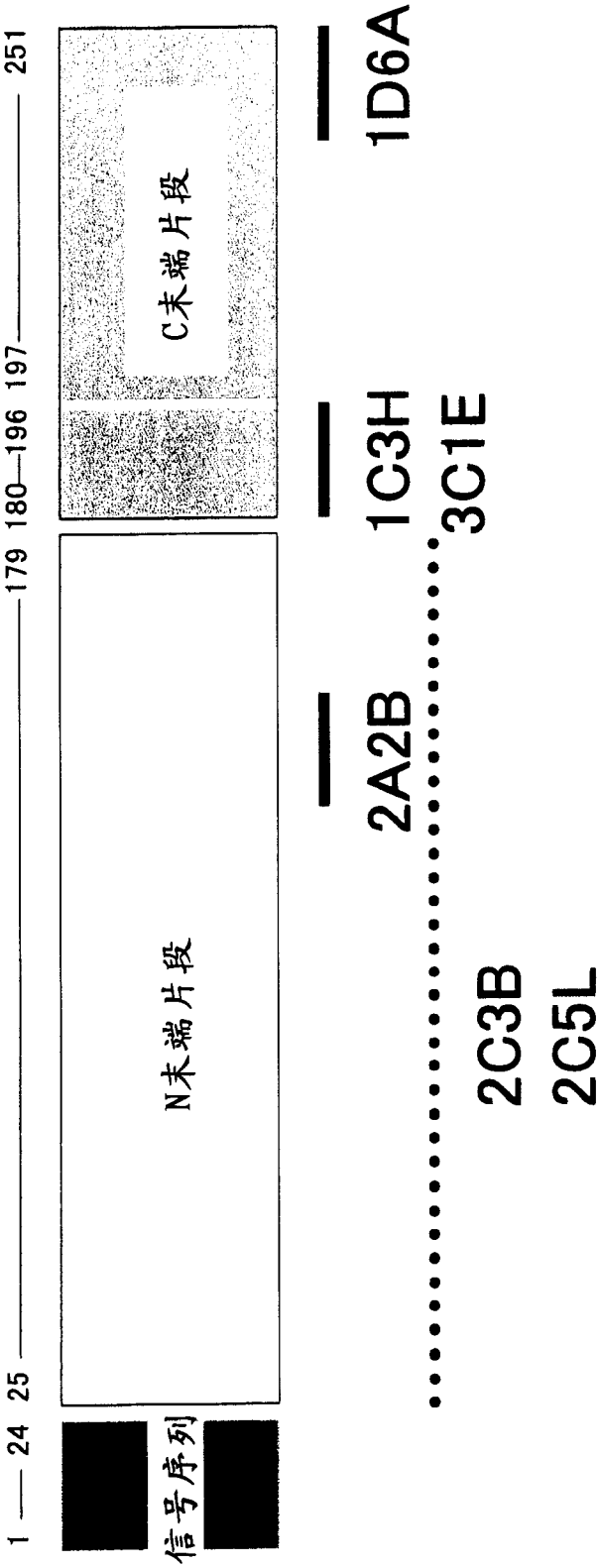


图 5

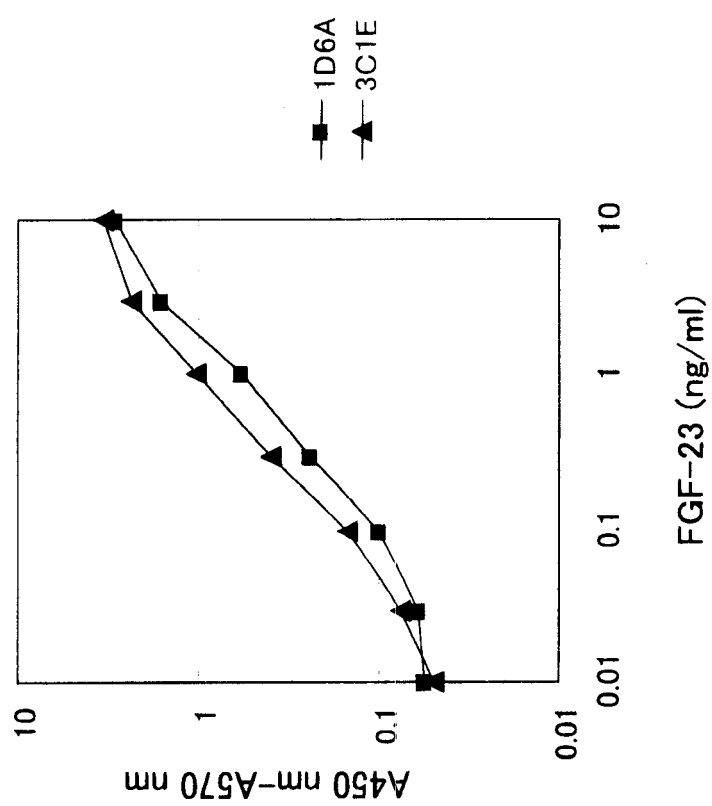


图 6

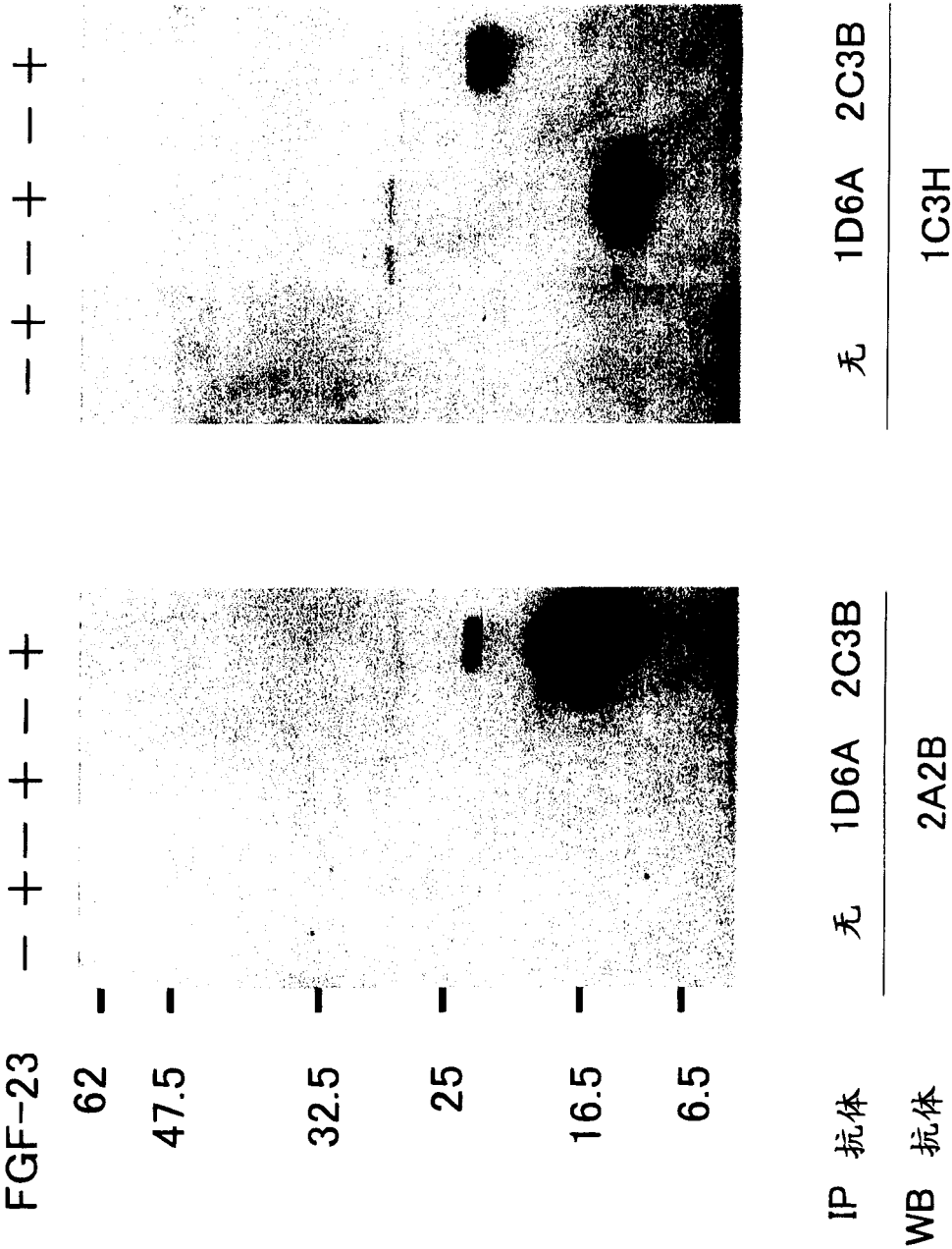


图 7

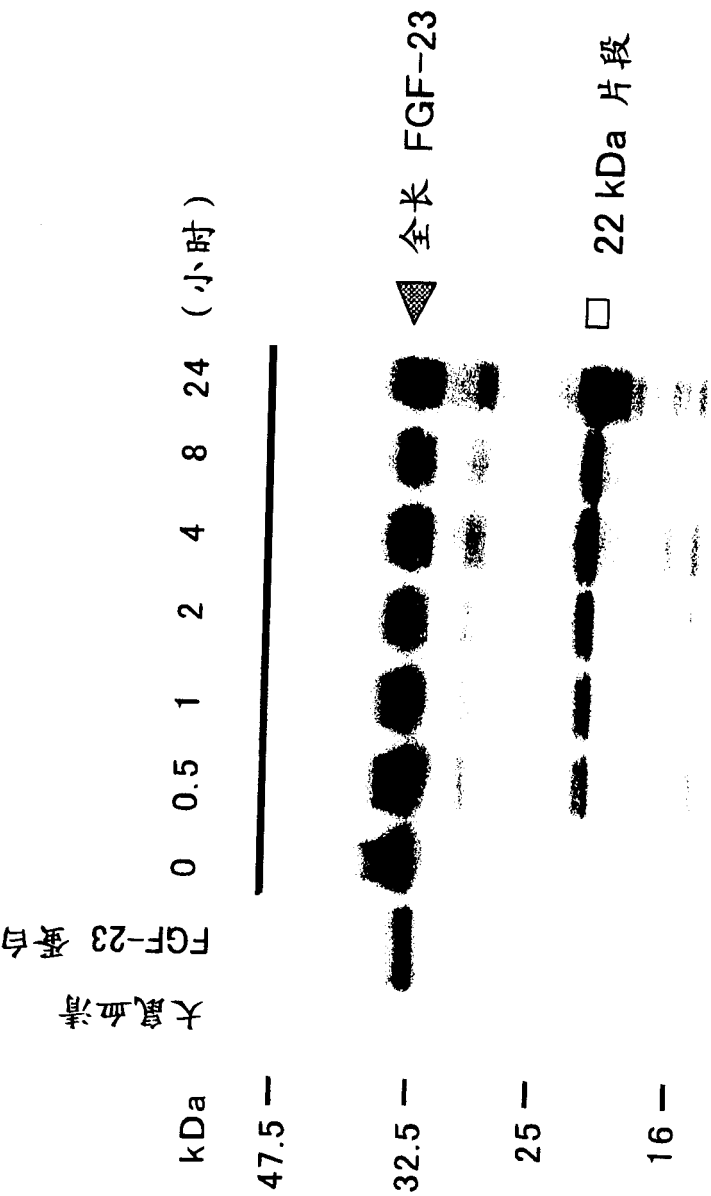


图 8

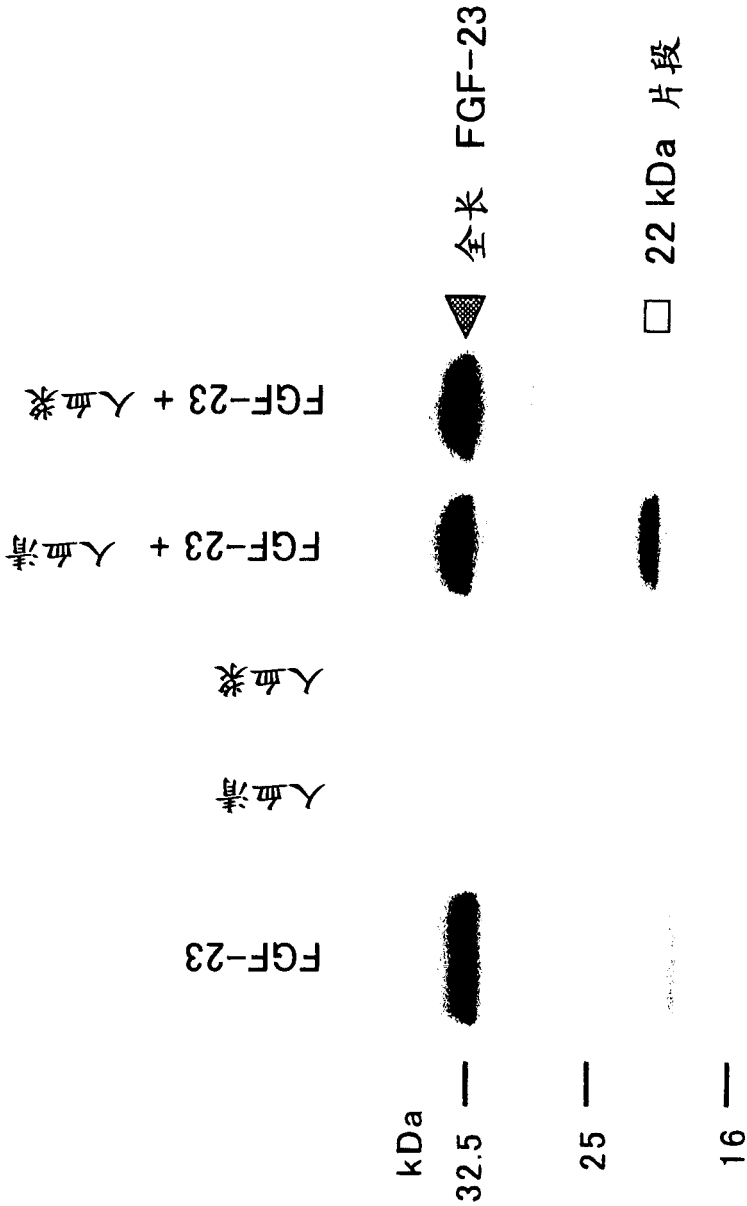


图 9

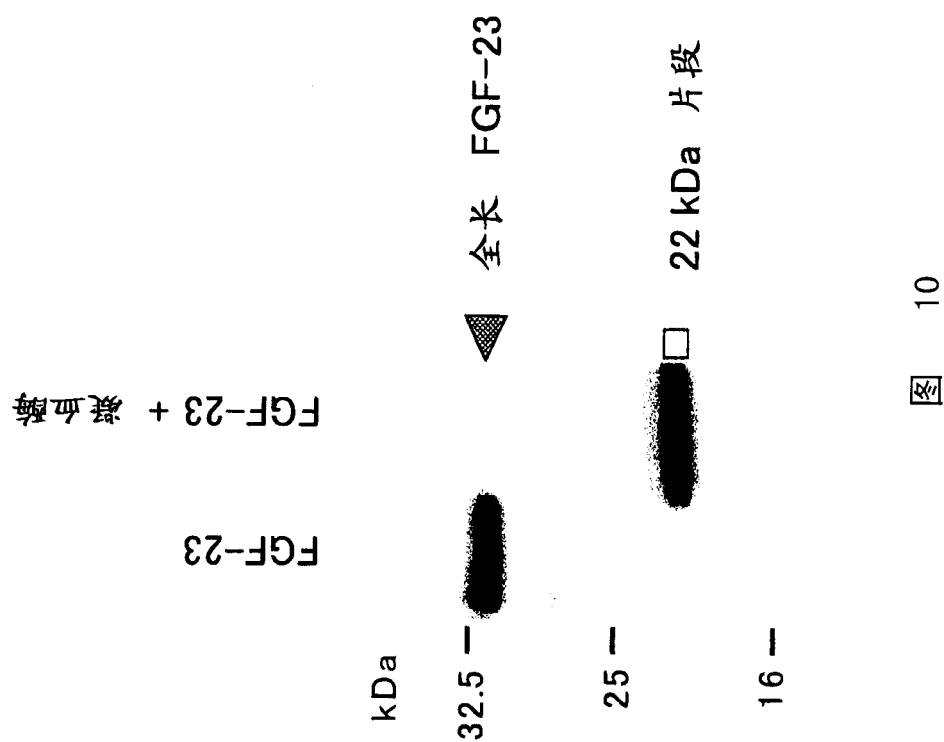


图 10



图 11

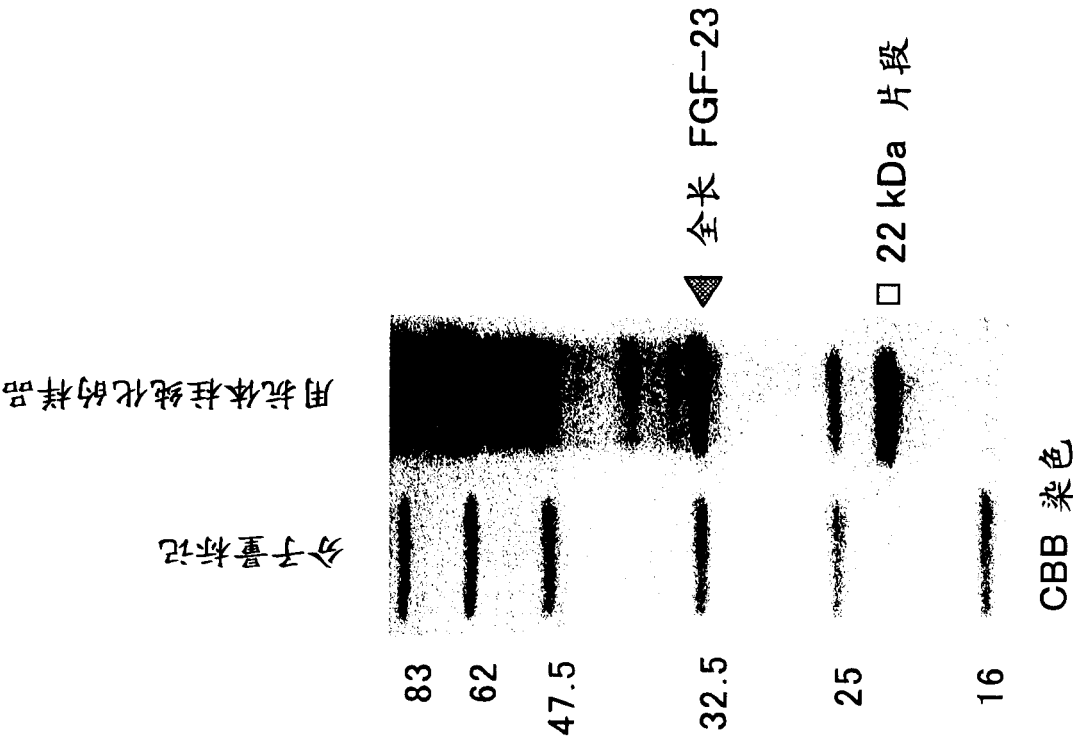


图 12

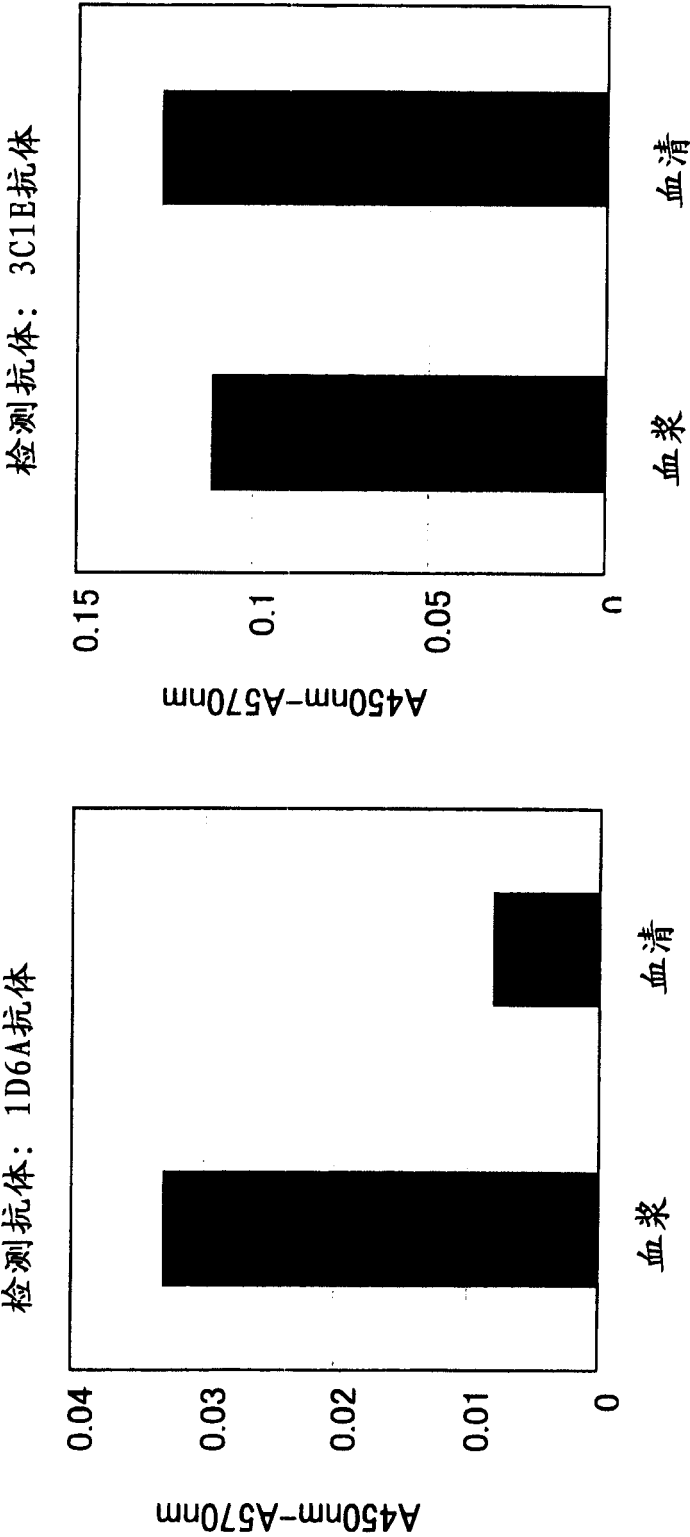


图 13

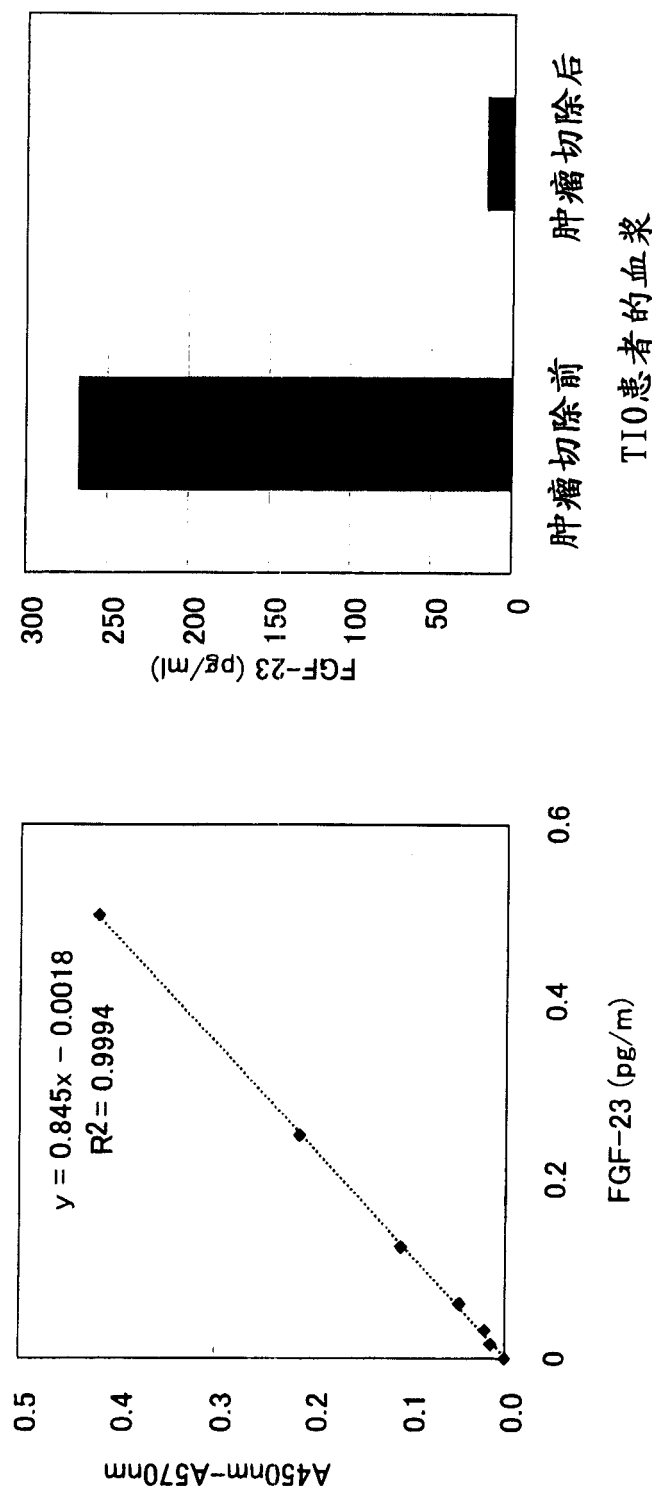


图 14



图 15

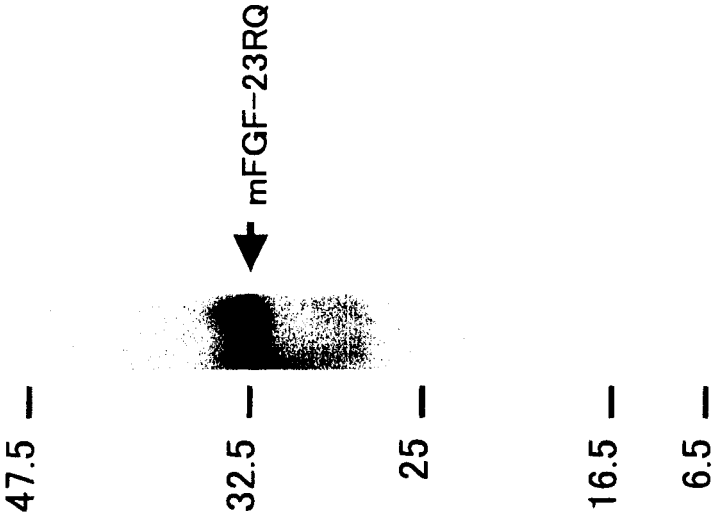


图 16 A

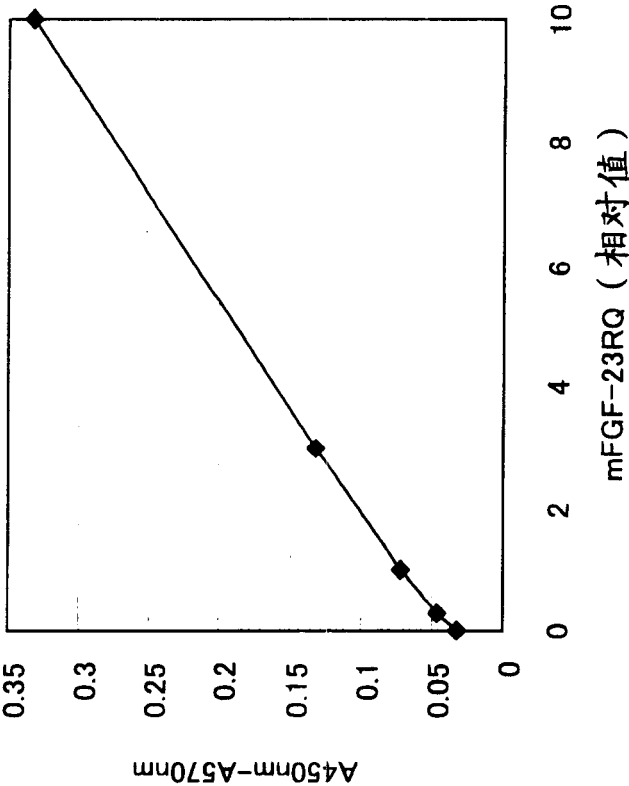


图 16 B

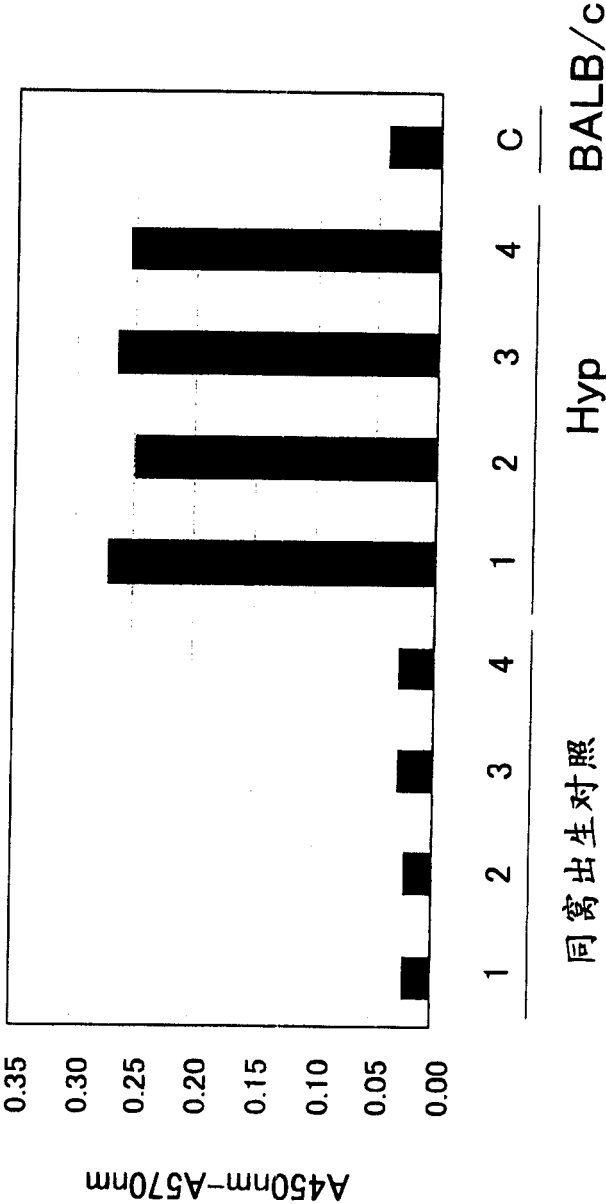


图 17

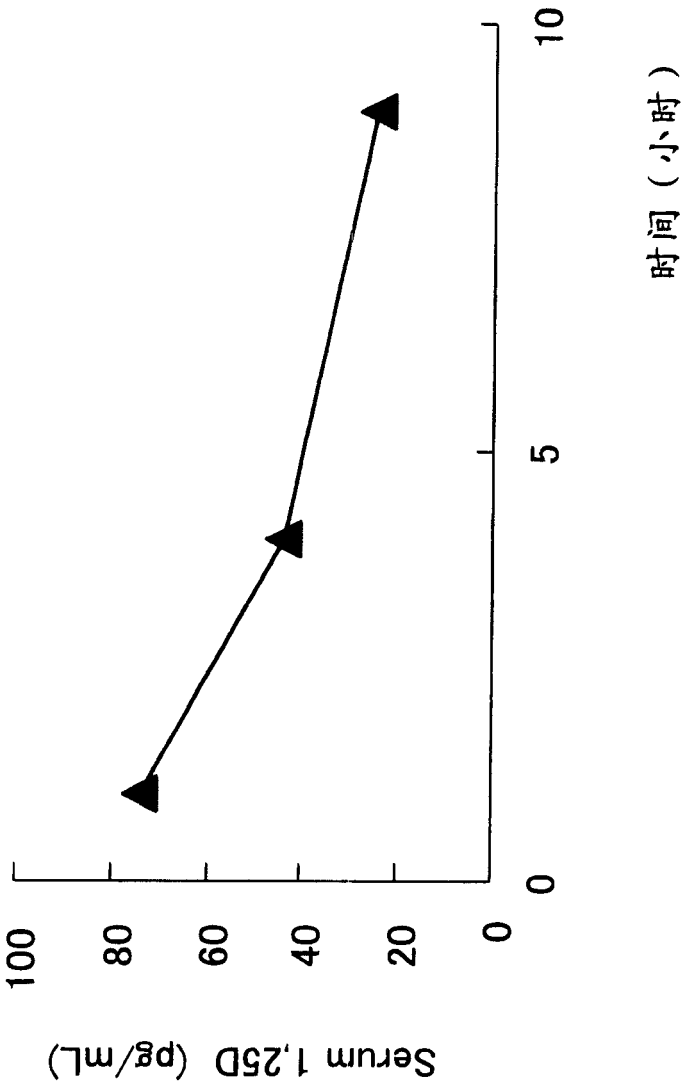


图 18A

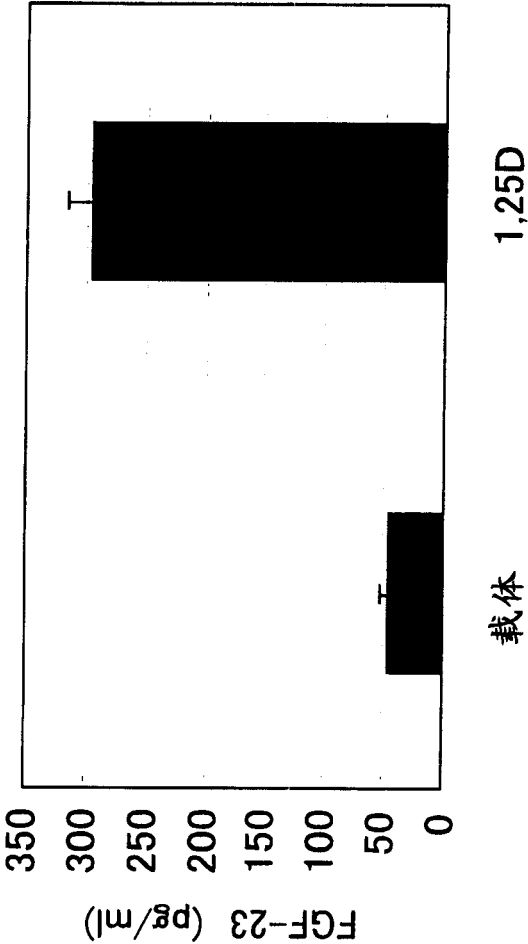


图 18 B

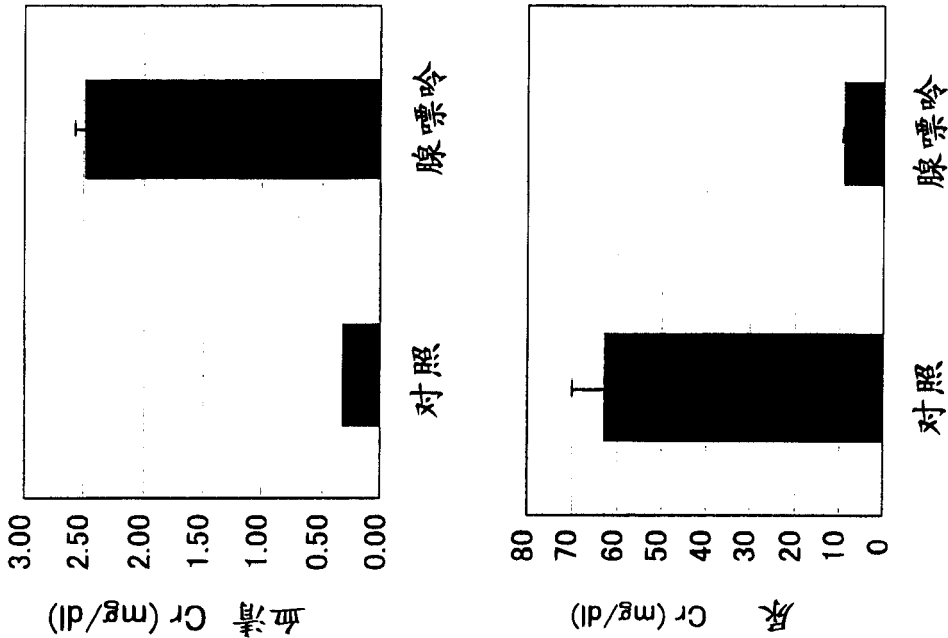


图 19B

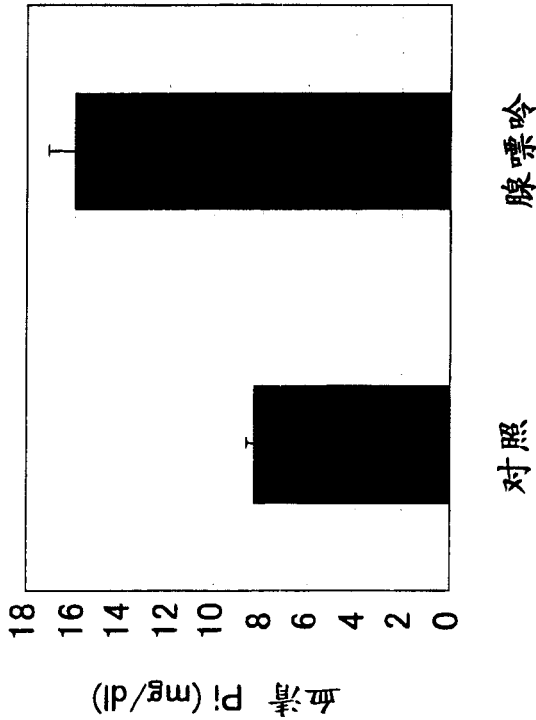


图 19A

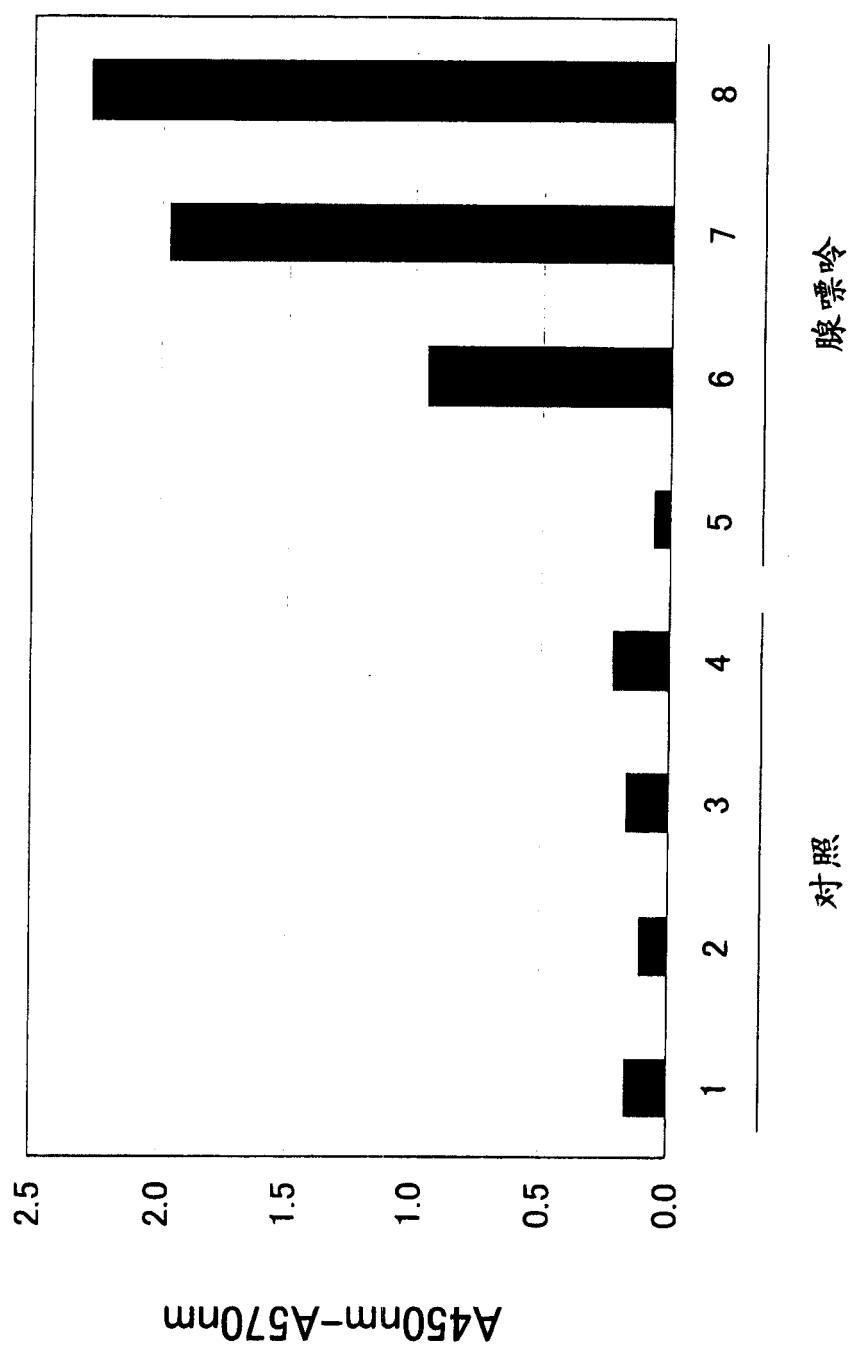


图 19C

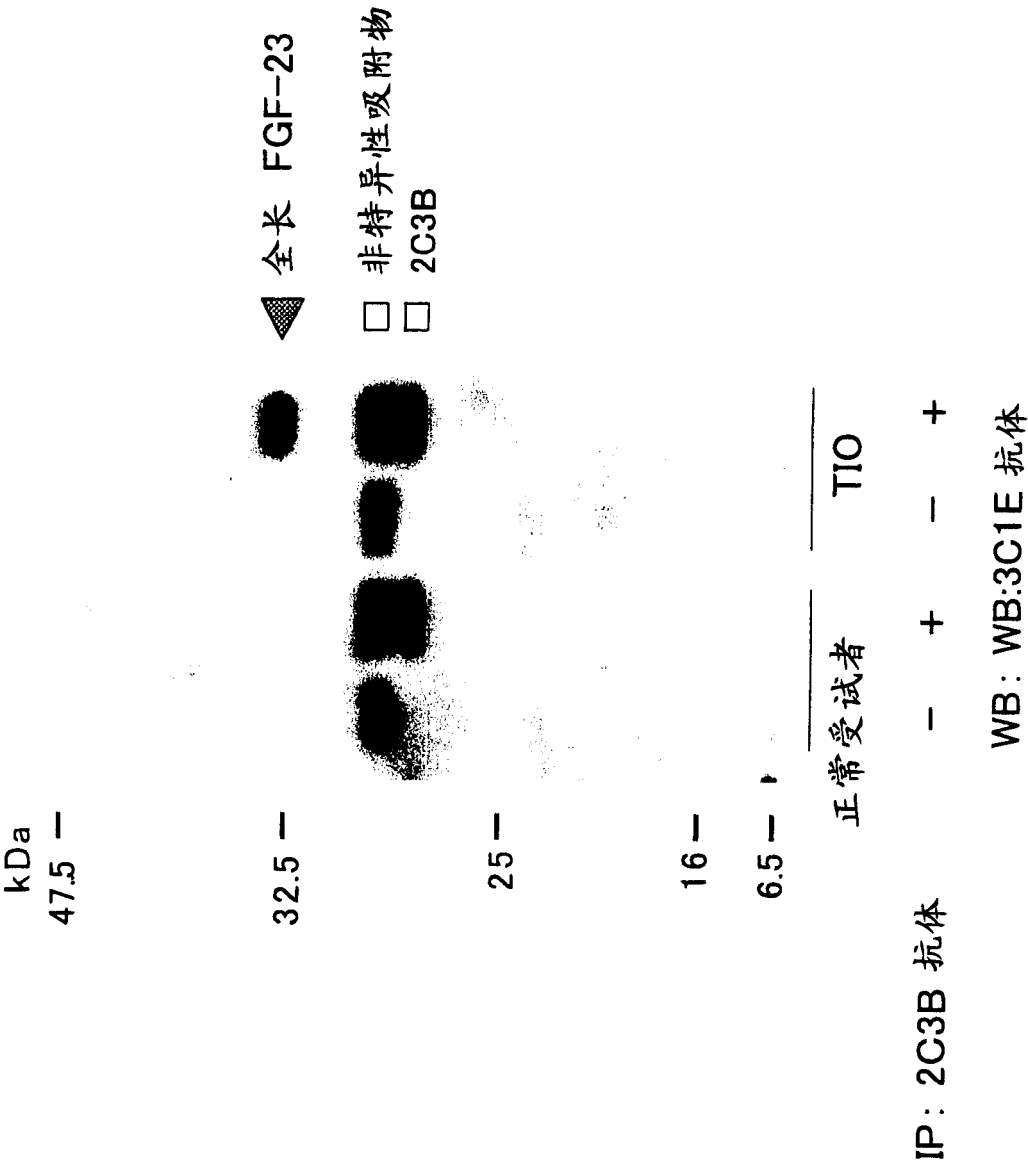


图 20

组的组成	施用的物质	小鼠数	磷酸盐 (mg/dL)	钙 (mg/dL)	1,25(OH) ₂ D (pg/mL)
组 1:	PBS	4	8.95 +/- 0.31	9.41 +/- 0.20	118.1 +/- 8.1
组 2:	1D6A	4	6.65 +/- 0.47 *	9.50 +/- 0.17	84.0 +/- 2.6 *
组 3:	2C3B	4	10.73 +/- 1.22	9.74 +/- 0.14	192.5 +/- 3.9 *
组 4:	3C1E	4	11.76 +/- 0.42 *	9.49 +/- 0.04	78.5 +/- 2.2 *
组 5:	Anti-TPO 抗体	4	8.93 +/- 0.41	9.41 +/- 0.08	147.9 +/- 3.8 *

图 21A

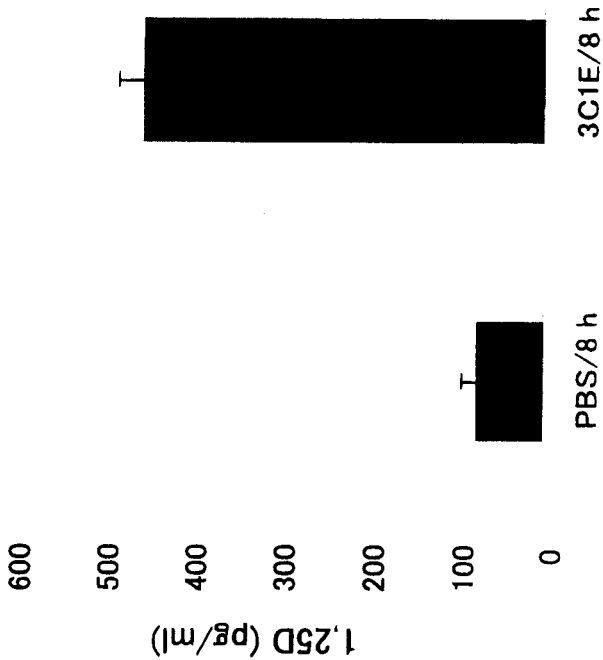


图 21B

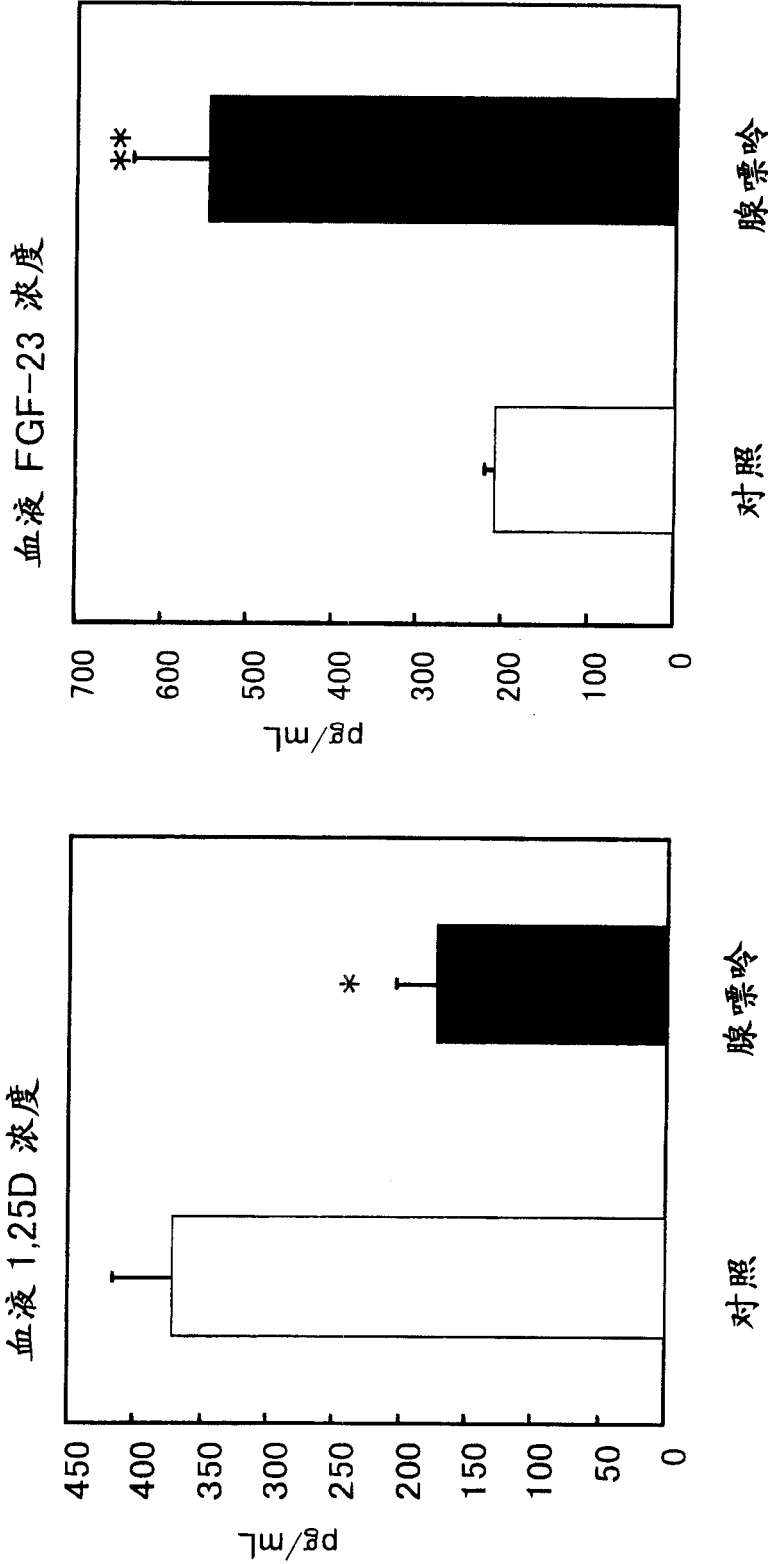


图 22A

图 22B

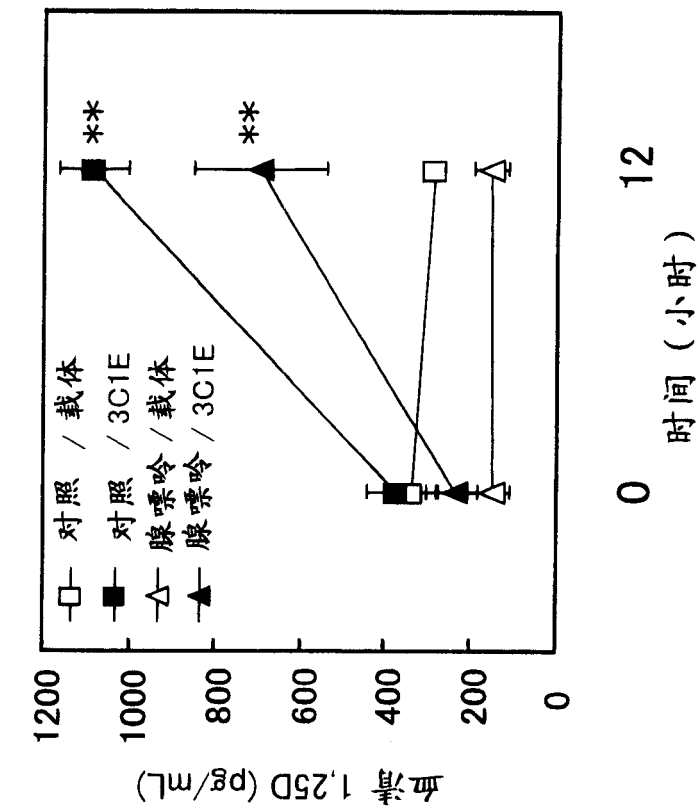


图 22D

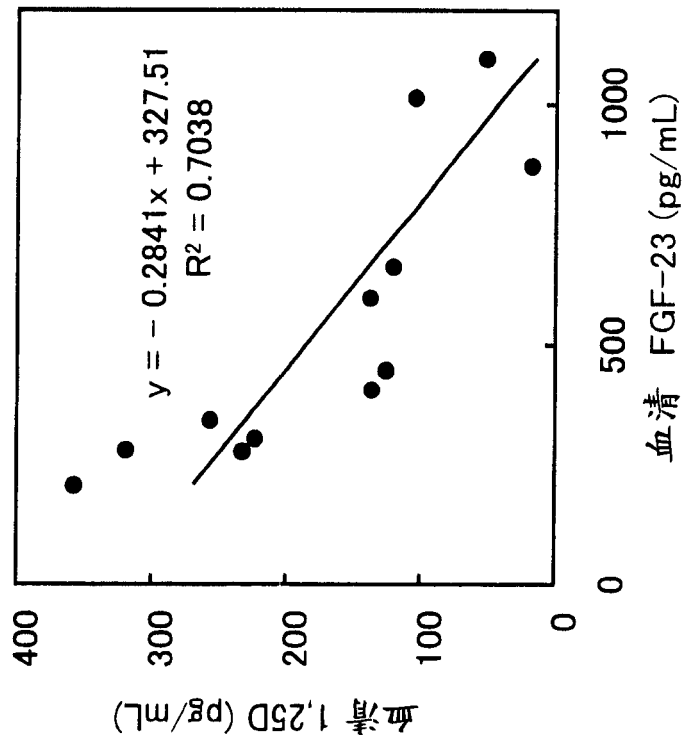


图 22C

	年龄	性别	FGF-23(ng/L)	PHEX基因中的突变
病例 1	3 个月	男	111.3	2071-1 g→a (内含子20)
	1 岁		380.3	
病例 2	38 岁	女	39.0	2071-1 g→a (内含子20)
病例 3	5 岁	女	55.7	849+1 g→a (内含子7)
	13 岁		68.6	
病例 4	15 岁	女	115.0	2071-2 a→g (内含子20)
病例 5	18 岁	女	107.6	2071-2 a→g (内含子20)
病例 6	67 岁	女	96.5	Q189X (外含子5)

图 23

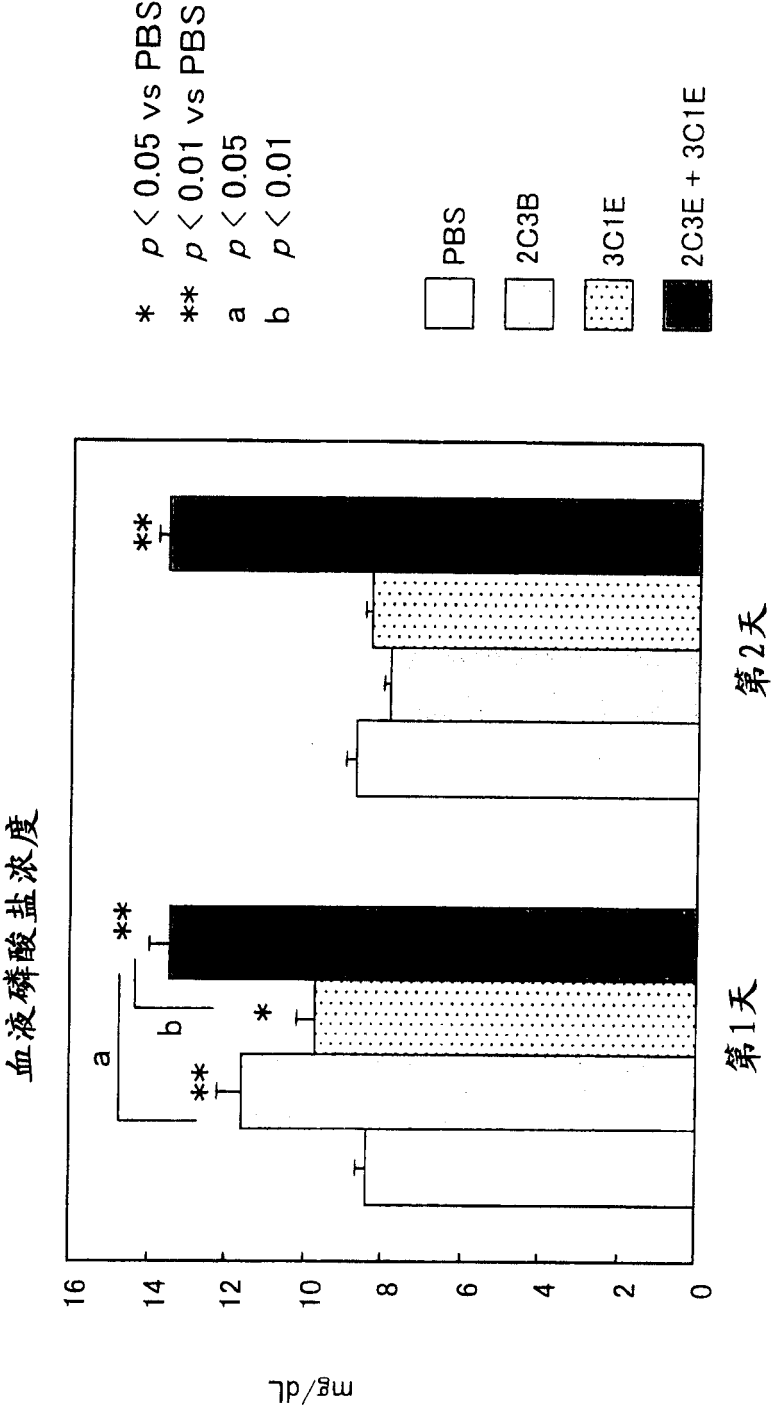


图 24

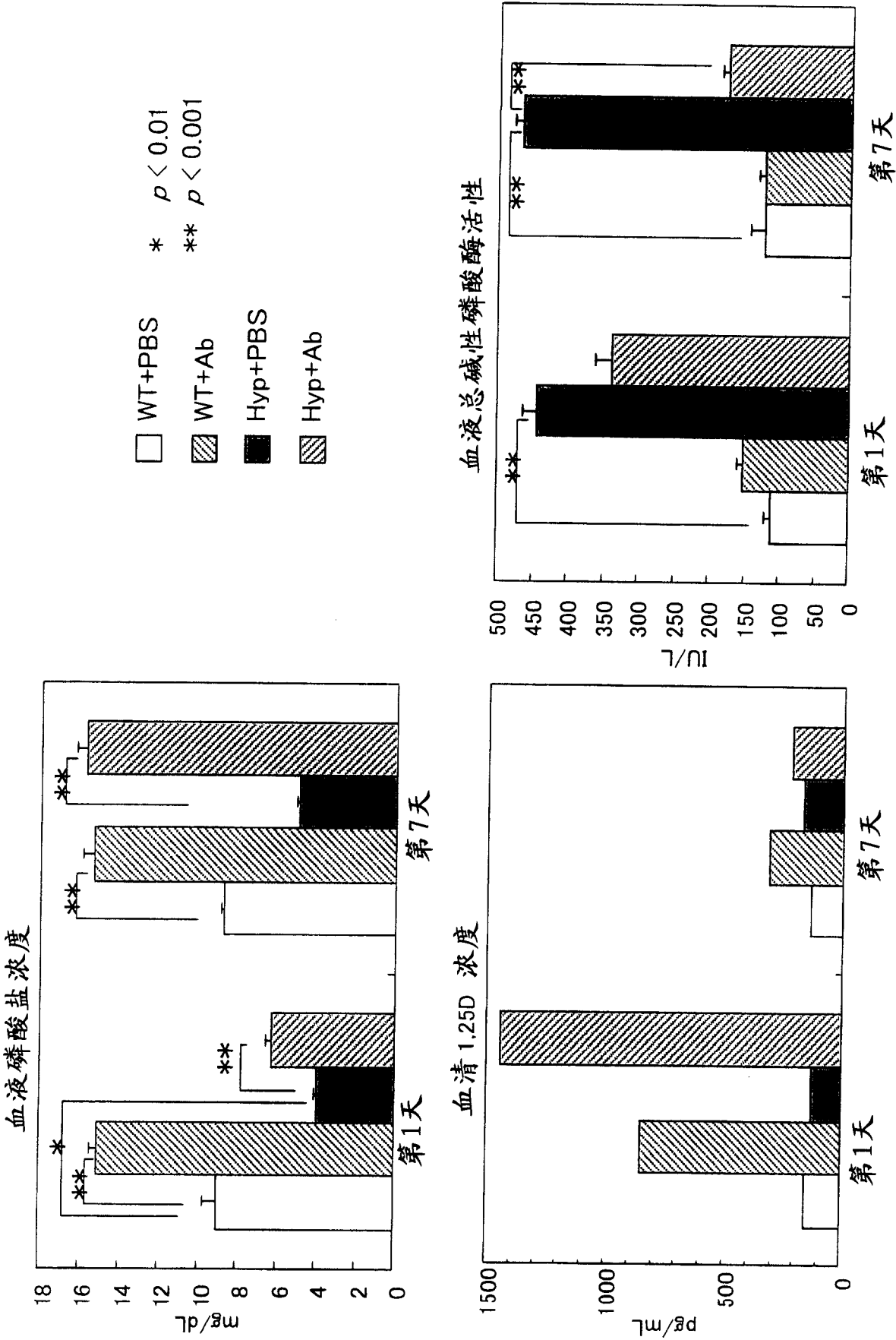


图 25A

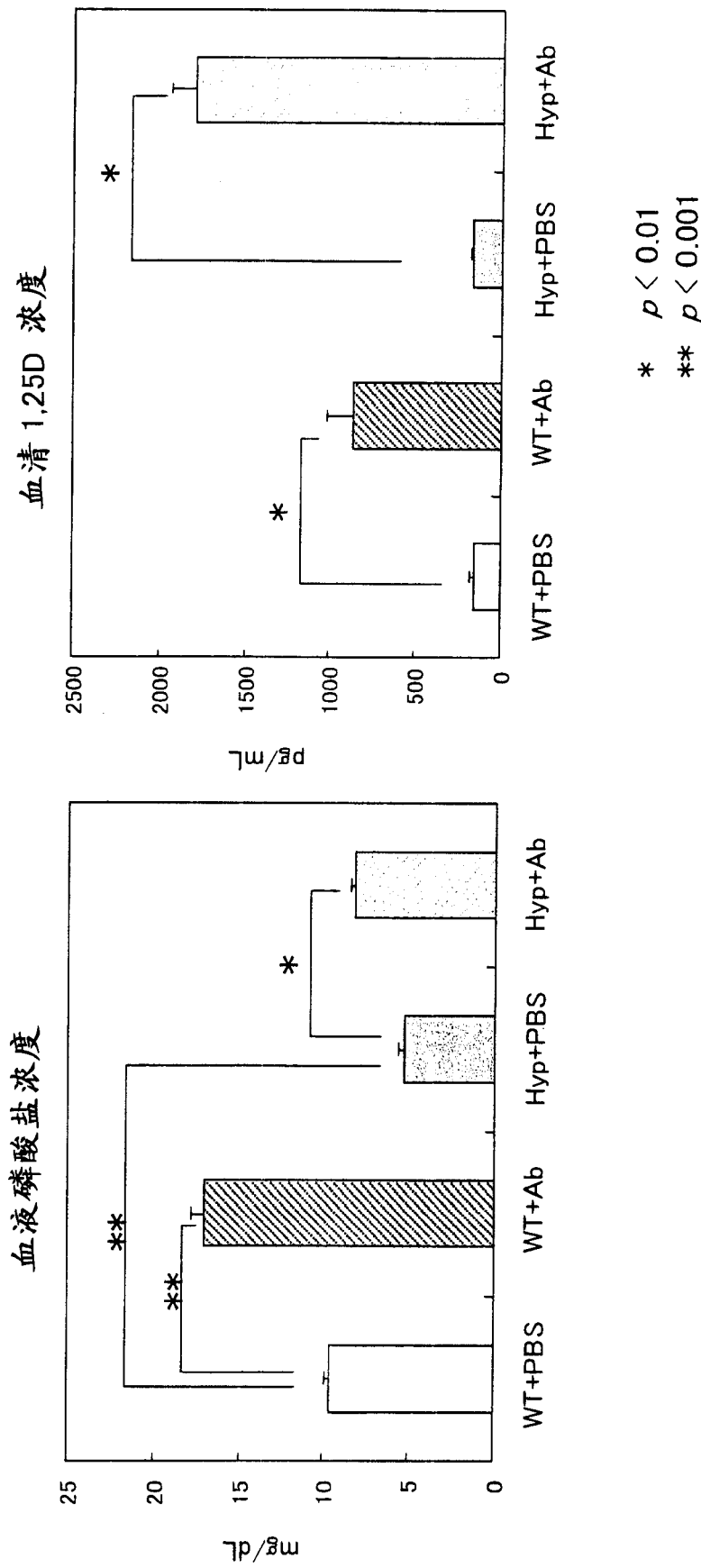
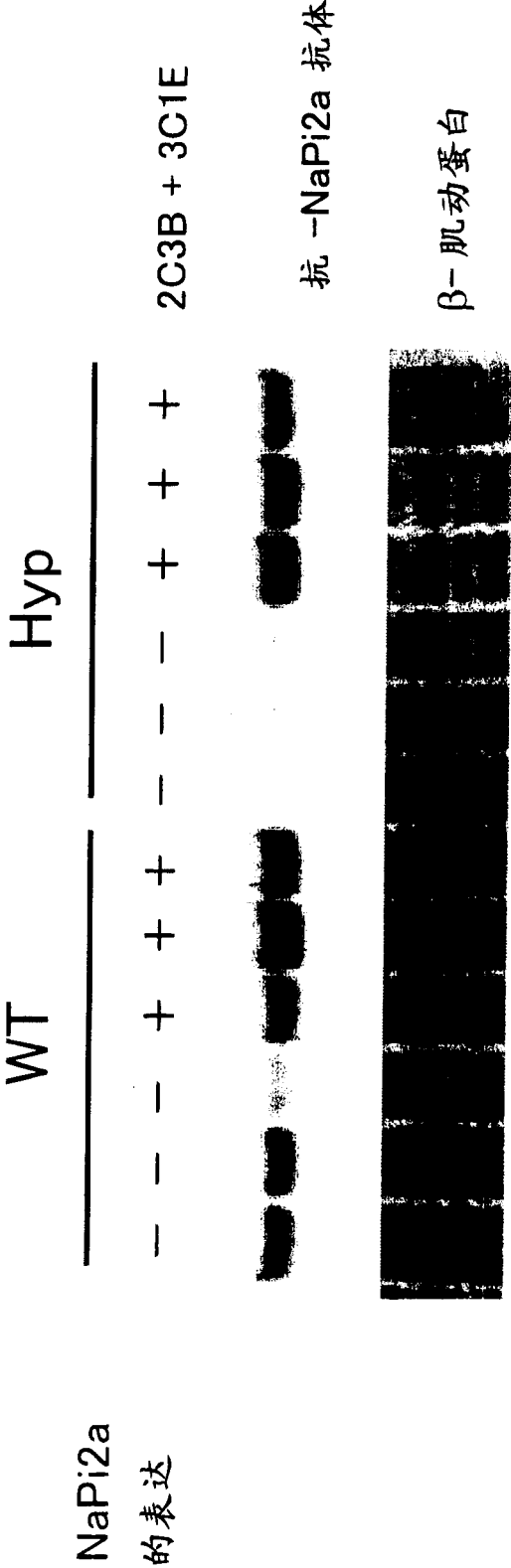


图 25B



磷酸盐转运活性

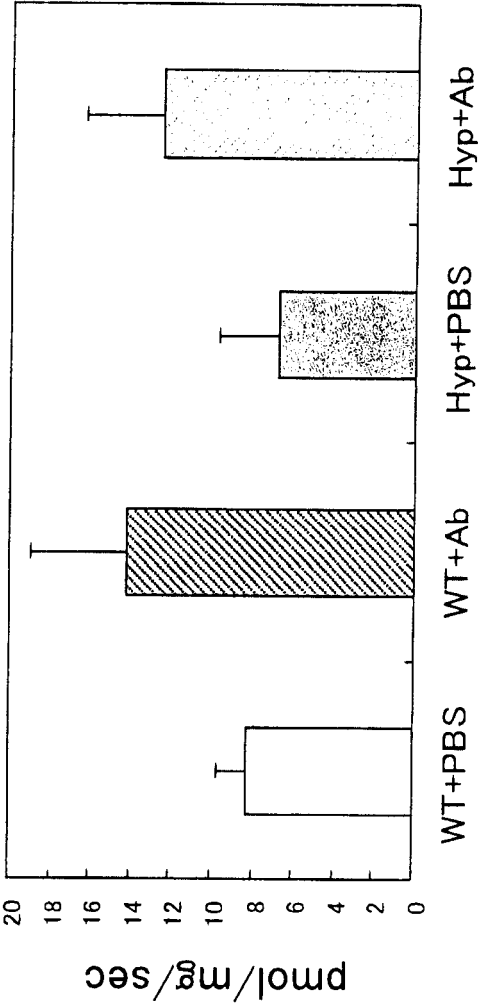


图 25 C

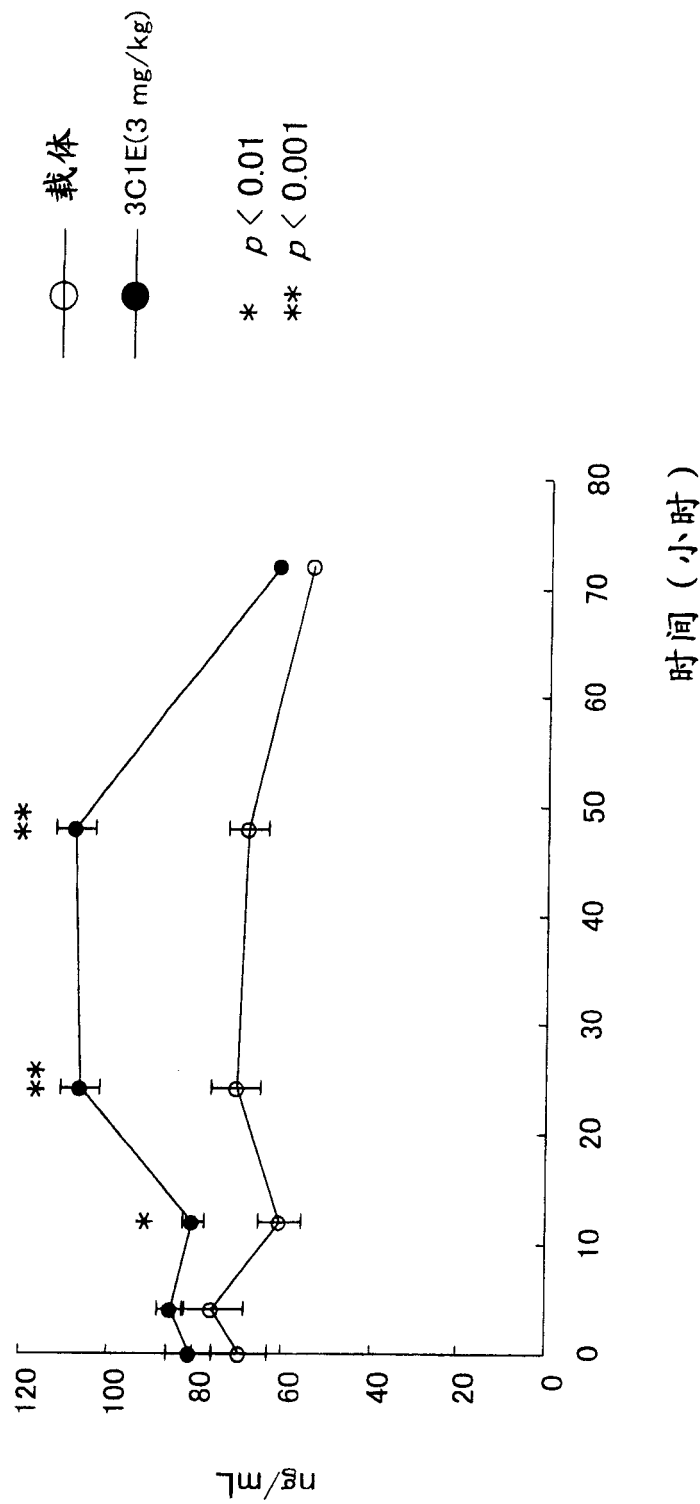


图 26

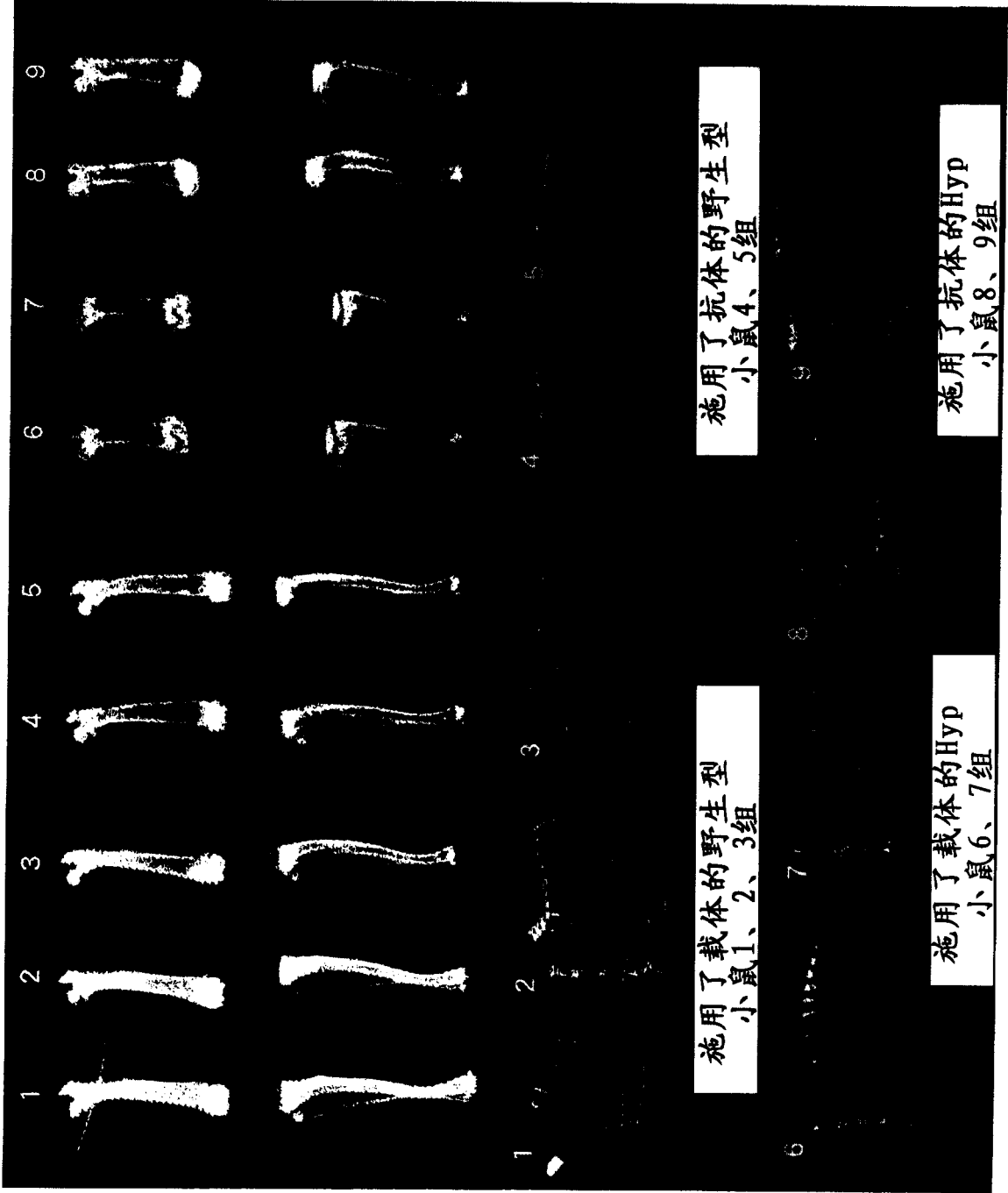


图 27

股骨

胫骨

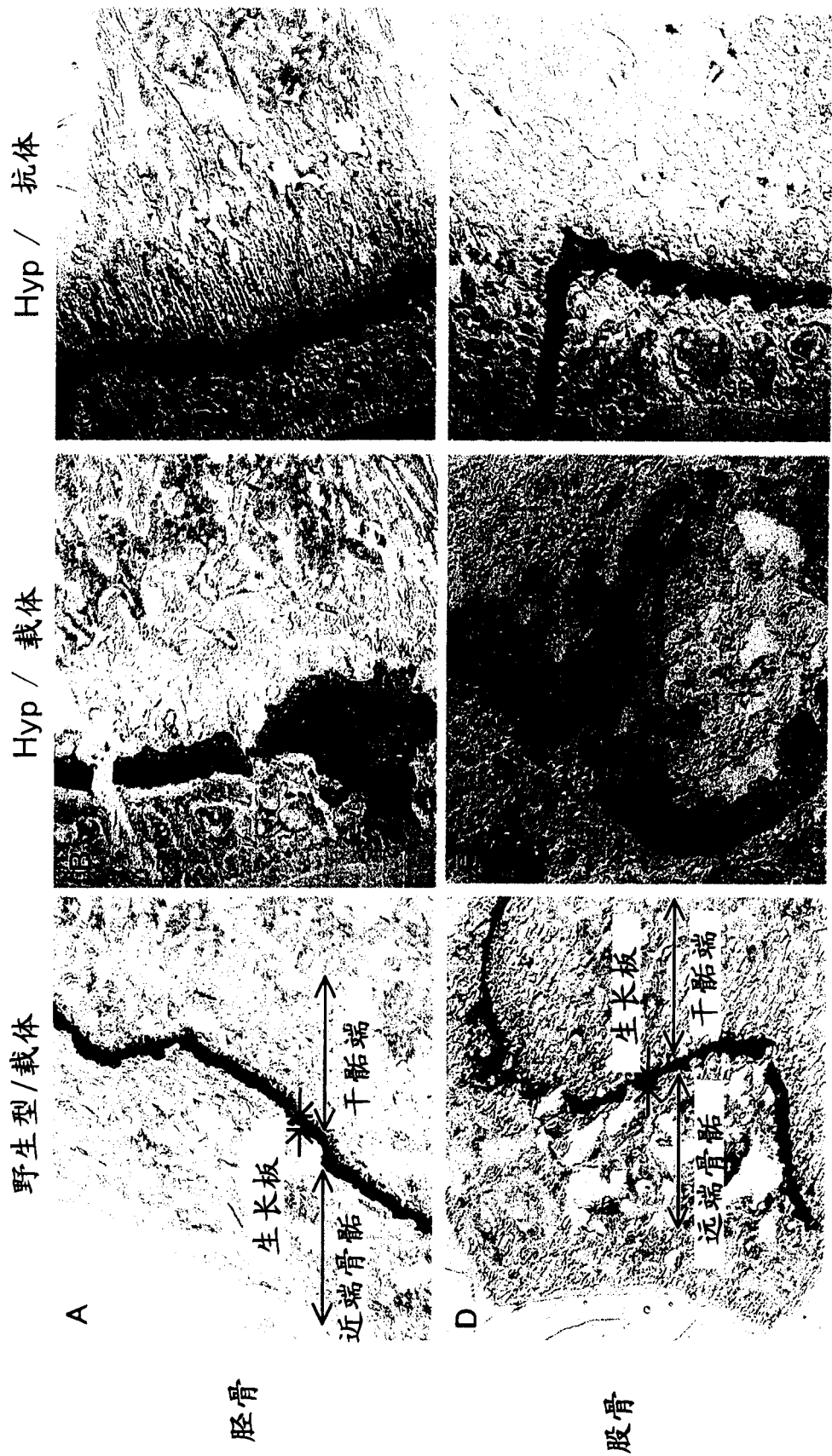
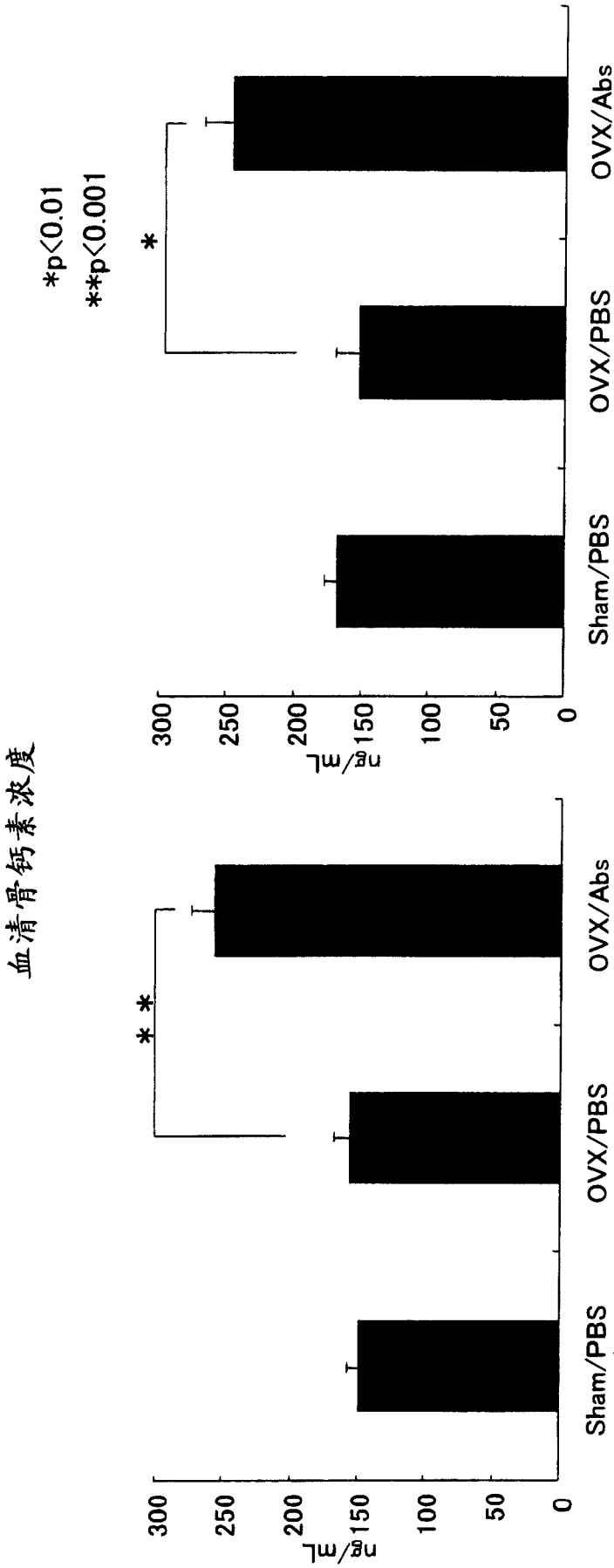


图 28



卵巢切除后两周

图 29 B

卵巢切除后四周

图 29 A

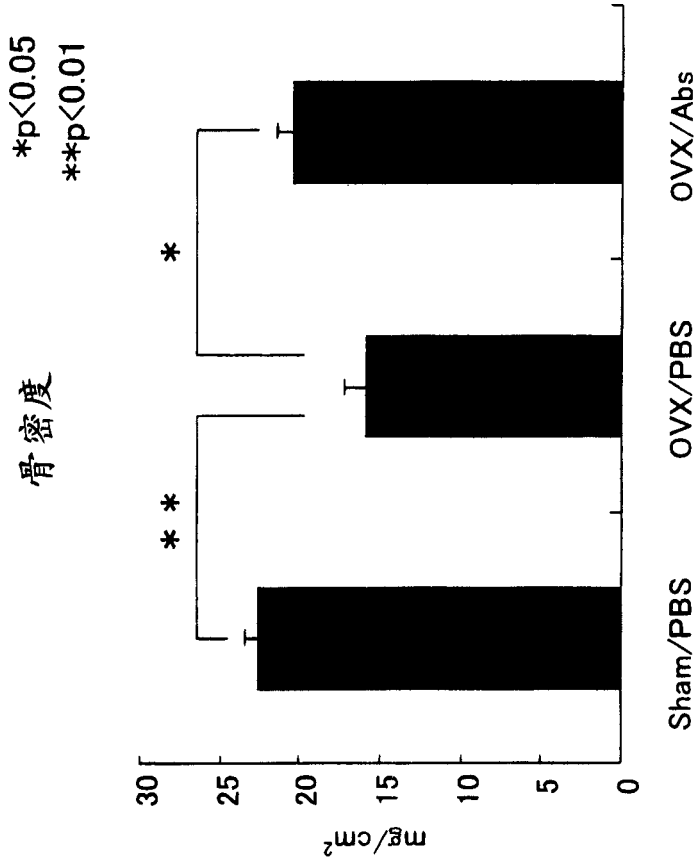


图 30 B

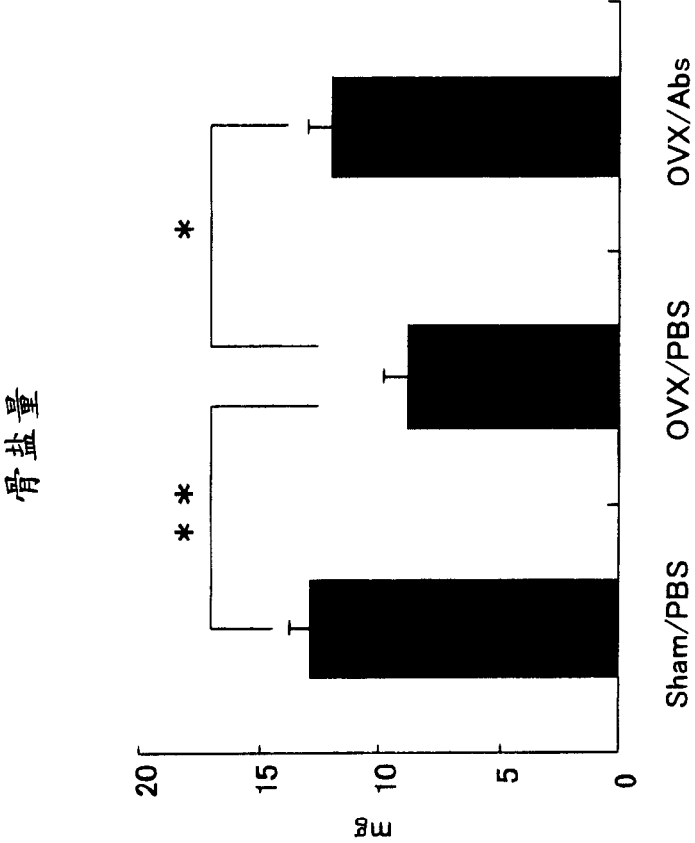


图 30 A

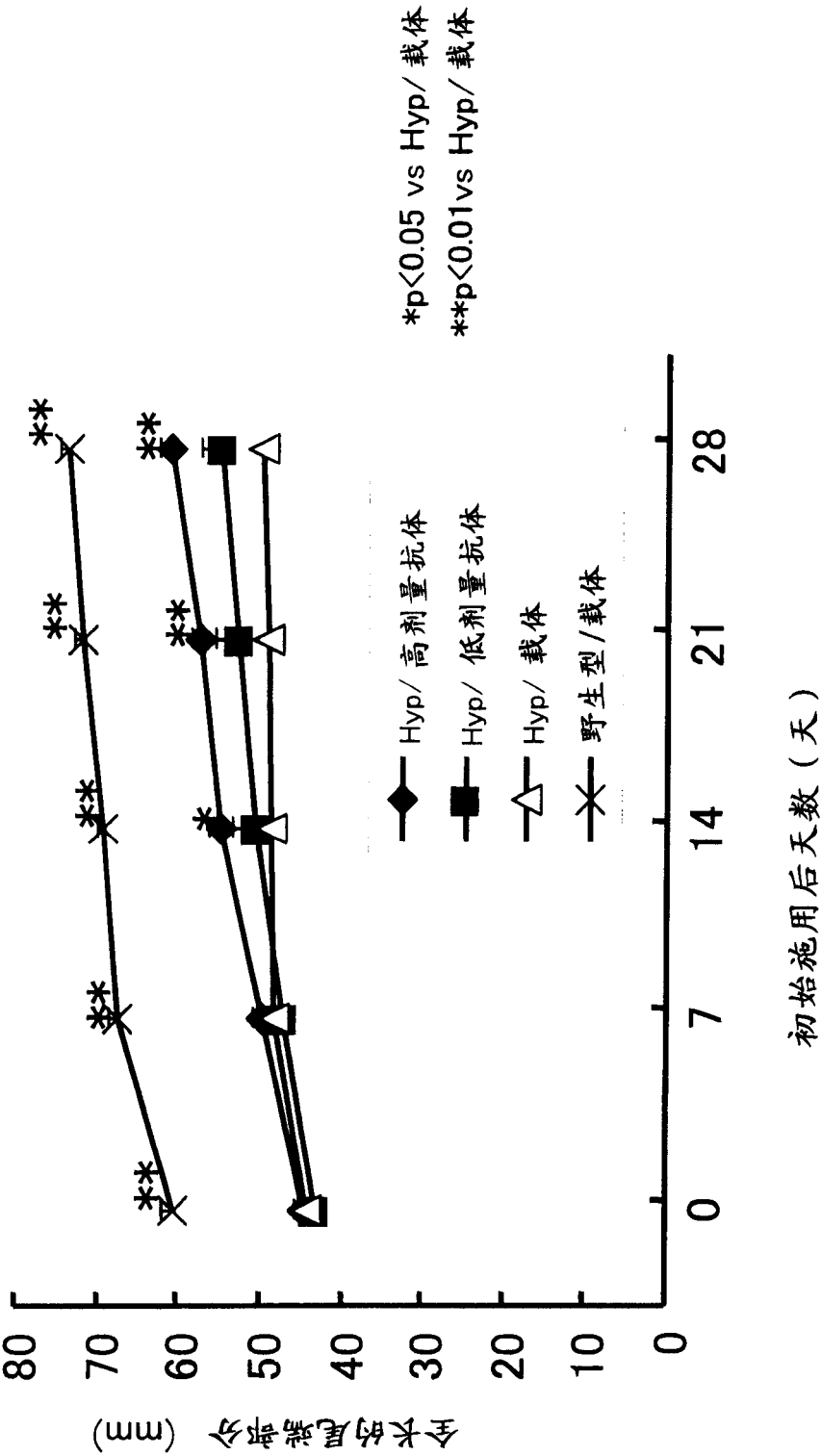


图 31 A

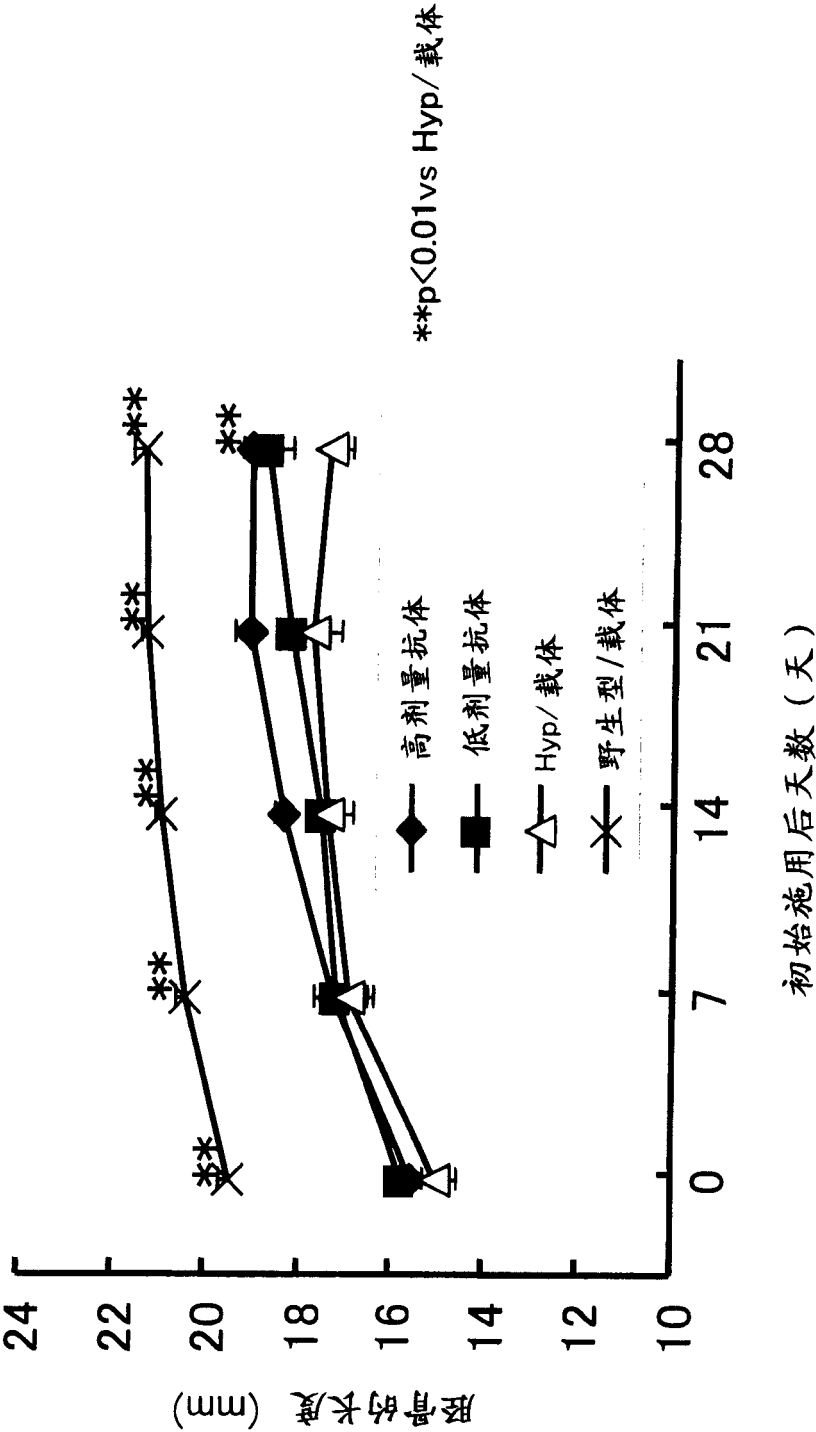


图 31 B

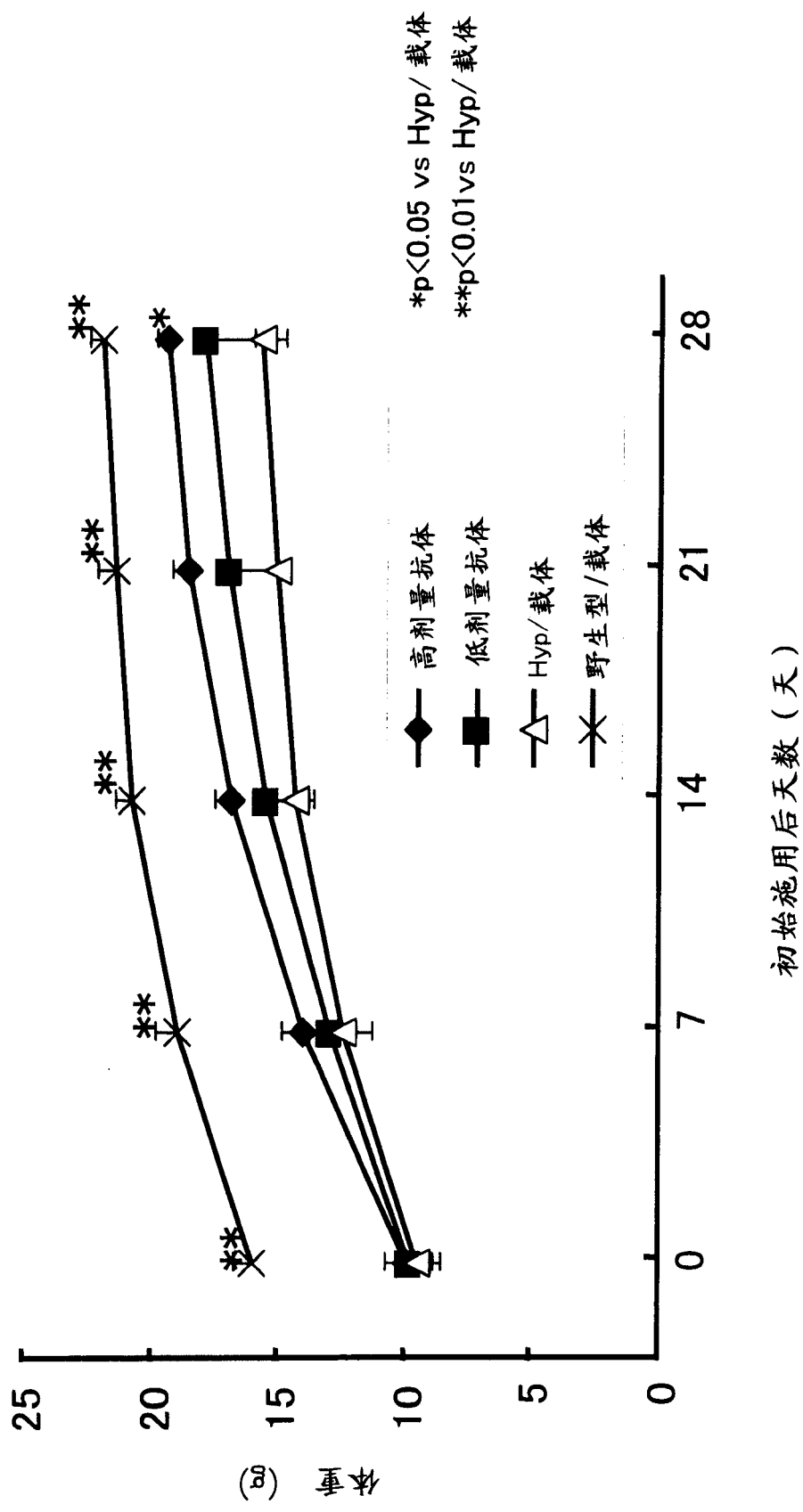


图 31C

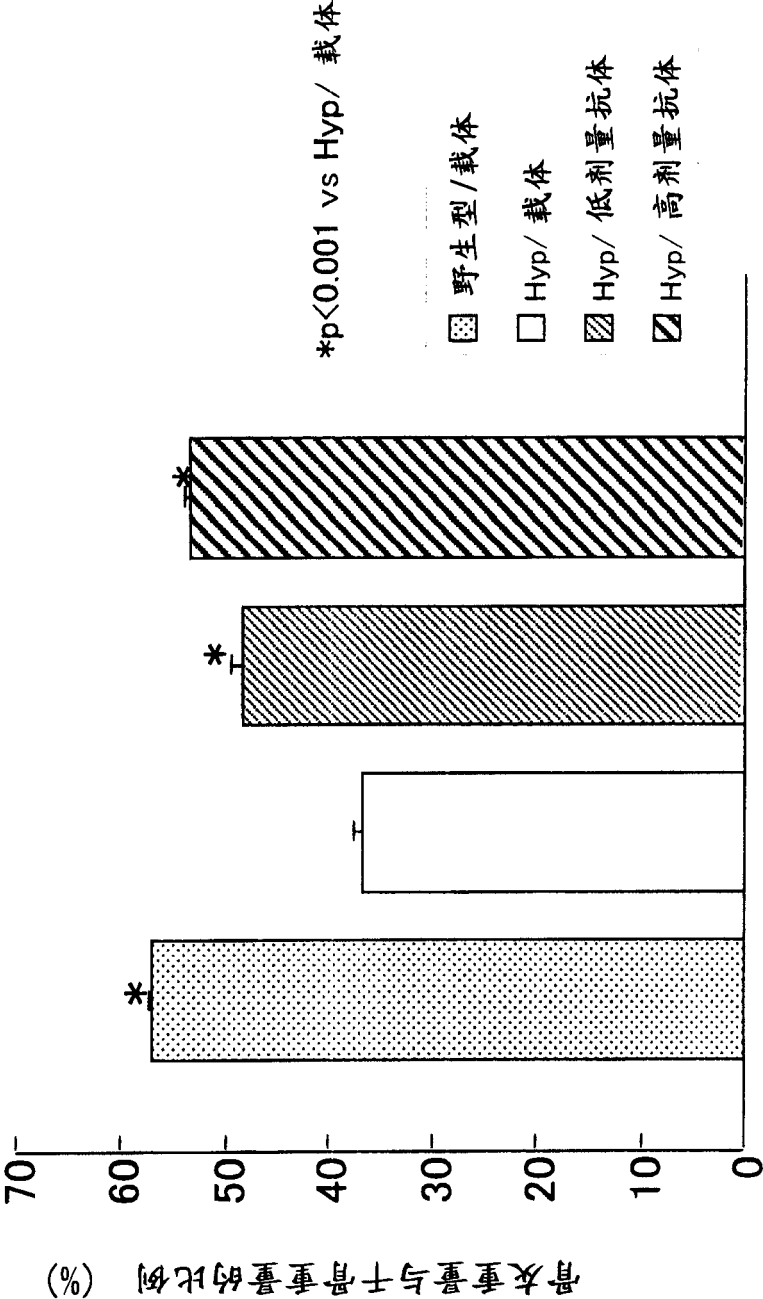


图 32

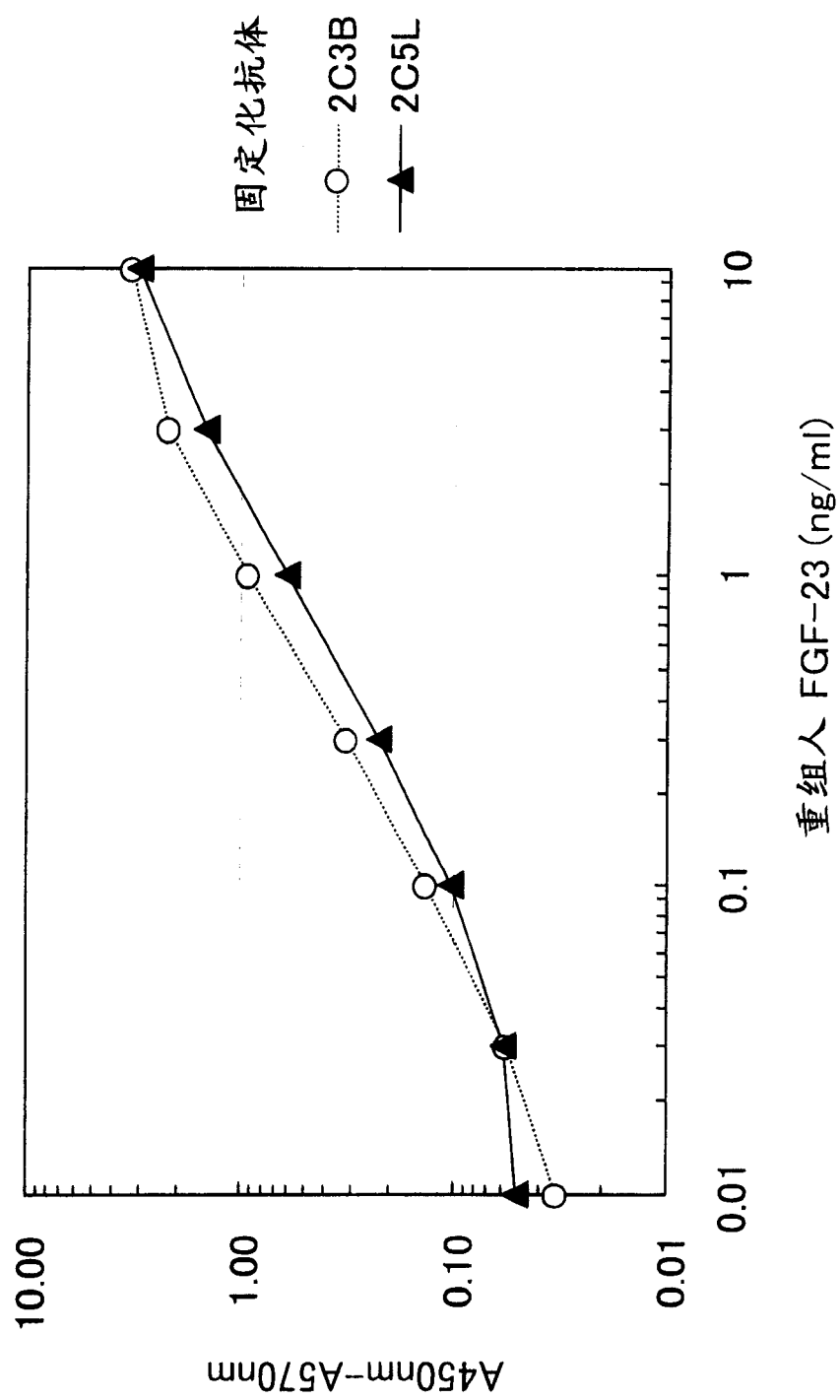


图 33

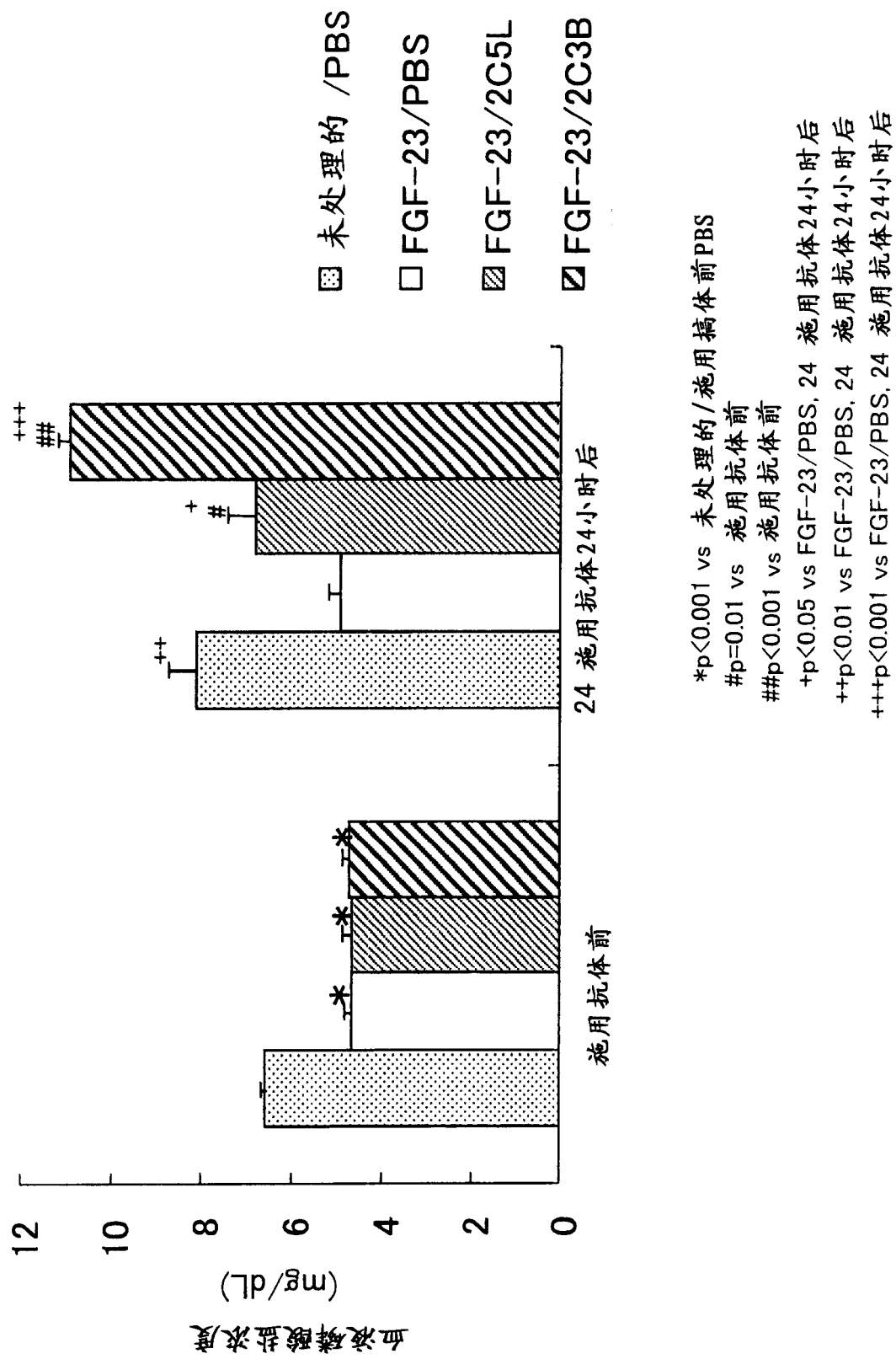


图 34

专利名称(译)	抗成纤维细胞生长因子23的抗体		
公开(公告)号	CN1639193A	公开(公告)日	2005-07-13
申请号	CN03804857.4	申请日	2003-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
[标]发明人	山崎雄司 岛田考志 山下武美		
发明人	山崎雄司 岛田考志 山下武美		
IPC分类号	A61K39/00 A61P19/08 C07K14/50 C07K16/22 C12P21/08 C07K16/18 C12N15/00 A61K39/395 G01N33/53 C12Q1/00		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 A61P3/00 A61P3/12 A61P3/14 A61P5/06 A61P5/18 A61P5/20 A61P7/08 A61P13/00 A61P13/12 A61P17/04 A61P19/00 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P35/00 C07K14/50 C07K16/22		
代理人(译)	刘玥		
优先权	2001401689 2001-12-28 JP 2002262020 2002-09-06 JP		
其他公开文献	CN100519584C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供抗成纤维细胞生长因子 - 23 的抗体。即，具有控制磷酸盐代谢或维生素D代谢的活性的抗体，和相应于(a)，(b)，(c)中的抗体，该抗体是通过利用包含一种如SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列的多肽或包含一种从SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列中通过缺失、替代或添加一个至多个氨基酸而衍生得到的一段氨基酸序列，并且具有成纤维生长因子23活性的多肽免疫动物得到的。(a)一种识别如SEQ ID NO：1所示氨基酸序列中的介于第180至第194位或第237至第251位之间的氨基酸序列的抗体。(b)一种由保藏号为FERM BP - 7838，FERM BP - 7839，FERM BP - 7840，或FERM BP - 8268的杂交瘤所产生的抗体。(c)一种可与保藏号为FERM BP - 7838，FERM BP - 7839，FERM BP - 7840，或FERM BP - 8268的杂交瘤所产生的抗体竞争的抗体。

