



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103608676 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201280028543. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 04. 23

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

2011-096718 2011. 04. 25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/060818 2012. 04. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/147670 JA 2012. 11. 01

(71) 申请人 协和梅迪克斯株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 滨野高行 猪阪善隆 松井功

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王灵菇 白丽

权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

肾功能衰竭的预后判断方法

(57) 摘要

本发明涉及肾功能衰竭的预后判断方法和肾功能衰竭的预后判断用试剂盒,所述肾功能衰竭的预后判断方法的特征在于,对生物体试样中的成纤维细胞生长因子-23及25羟化维生素D进行测定;所述肾功能衰竭的预后判断用试剂盒的特征在于,包含成纤维细胞生长因子-23测定试剂及25羟化维生素D测定试剂。通过本发明,能够提供对于确定给药的选定、更严密的饮食疗法、早期透析导入等治疗方针有用的肾功能衰竭的预后判断方法及肾功能衰竭的预后判断用试剂盒。

1. 一种肾功能衰竭的预后判断方法,其特征在于,对生物体试样中的成纤维细胞生长因子-23及25羟化维生素D进行测定。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,成纤维细胞生长因子-23通过免疫学测定方法进行测定。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,25羟化维生素D通过免疫学测定方法进行测定。
4. 一种肾功能衰竭的预后判断用试剂盒,其特征在于,包含成纤维细胞生长因子-23测定试剂及25羟化维生素D测定试剂。
5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中,成纤维细胞生长因子-23测定试剂为含有与成纤维细胞生长因子-23结合的抗体的试剂。
6. 根据权利要求4或5所述的试剂盒,其中,25羟化维生素D测定试剂为含有与25羟化维生素D结合的抗体的试剂。

肾功能衰竭的预后判断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肾功能衰竭的预后判断方法及肾功能衰竭的预后判断用试剂盒。

背景技术

[0002] 成纤维细胞生长因子-23 (以下称为 FGF-23) 为成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族中的一员, 为主要由骨组织产生的 251 个氨基酸构成的多肽, 其作用于肾脏从而抑制肾小管的磷的再吸收。近年来的研究启示, 低磷血症性佝偻病、肿瘤骨质软化病、肾功能衰竭等疾病与 FGF-23 相关 (参照非专利文献 1)。由此认为测定血中的 FGF-23 对于监测这些疾病的病理状态是有用的, 因此近年来成为倍受关注的标记物 (专利文献 1)。

[0003] 25 羟化维生素 D (以下称为 25 (OH)D) 是被吸收到体内的维生素 D 在肝脏其侧链的 25 位被羟化而成的。在体内, 进一步在肾其 1 位或 24 位被羟化而代谢成 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D ($1\alpha, 25$ (OH)₂D)、 $24, 25$ -二羟基维生素 D ($24, 25$ (OH)₂D)。

[0004] 维生素 D 本身几乎不具有生理活性, 而且由于代谢、向脂肪组织转移等, 血中浓度会发生较大变动, 因此通常不太对其进行测定。维生素 D 首先在肝脏被 25-羟化酶快速代谢而在体内转变为 25 (OH)D, 进而在肾脏被 1α -羟化酶将 1α 位羟化而代谢为活性型的 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D。

[0005] 活性型的 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D 促进从小肠吸收钙和磷, 并且促进骨盐从骨中溶出。另外, 还在肾脏促进钙和磷的再吸收, 从而在维持生物体的钙和磷的体内稳态方面发挥作用。

[0006] 维生素 D 不足会导致幼儿发生佝偻病、成人发生骨质软化病或骨质疏松症。由此认为测定 25 (OH)D 对于监测维生素 D 缺乏症和不足症的病理状态是有用的 (非专利文献 2)

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1 : W02003/057733 小册子

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献 1 : 腎と骨代謝、第 15 卷、第 4 号、第 351-356 頁 (2002)。

[0012] 非专利文献 2 : Kidney Int. Vol. 55(6), p. 2169-2177 (1999)。

发明内容

[0013] 发明要解决的课题

[0014] 本发明的目的在于提供对于确定肾功能衰竭患者的治疗方针有效的肾功能衰竭的预后判断方法及预后判断用试剂盒。

[0015] 用于解决课题的手段

[0016] 本发明者们为了解决上述课题进行了深入研究, 结果获得了以下认知, 通过测定试样中的 FGF-23 及 25 (OH)D 并将其测定值组合起来进行评价, 能够判断肾功能衰竭的预

后,从而完成了本发明。即,本发明涉及以下的[1]~[6]。

[0017] [1]一种肾功能衰竭的预后判断方法,其特征在于,对生物体试样中的 FGF-23 及 25(OH)D 进行测定。

[0018] [2]根据[1]所述的方法,其中,FGF-23 通过免疫学测定方法进行测定。

[0019] [3]根据[1]或[2]所述的方法,其中,25(OH)D 通过免疫学测定方法进行测定。

[0020] [4]一种肾功能衰竭的预后判断用试剂盒,其特征在于,包含 FGF-23 测定试剂及 25(OH)D 测定试剂。

[0021] [5]根据[4]所述的试剂盒,其中,FGF-23 测定试剂为含有与 FGF-23 结合的抗体的试剂。

[0022] [6]根据[4]或[5]所述的试剂盒,其中,25(OH)D 测定试剂为含有与 25(OH)D 结合的抗体的试剂。

[0023] 发明效果

[0024] 通过本发明,提供能够选定肾功能衰竭患者中的预后不良群体、并对于确定给药的选定、更严密的饮食疗法、早期透析导入等治疗方针有用的肾功能衰竭的预后判断方法及预后判断用试剂盒。

附图说明

[0025] 图 1 为对使用了患者基本信息以及各种测定值的与肾事件(血清肌酐倍增或透析导入)发病相关的风险的多变量分析的分析图。

[0026] 图 2 为对基于 25(OH)D 浓度的患者组(4 个组)及基于 FGF-23 浓度的患者组(Q1 ~ Q5 这 5 个组)的各组的与肾事件(血清肌酐倍增或透析导入)发病相关的风险的多变量分析的分析图。

[0027] 图 3 为表示 25(OH)D 低值且 FGF-23 低值组(df 组)、25(OH)D 高值且 FGF-23 低值组(Df 组)、25(OH)D 低值且 FGF-23 高值组(dF 组)、25(OH)D 高值且 FGF-23 高值组(DF 组)这 4 组的约 5 年间的无肾事件(血清肌酐倍增或透析导入)时的生存概率的 Kaplan-Meier 生存曲线。

[0028] 图 4 为在图 3 的研究中进一步用年龄、性别、糖尿病、心血管病疾患、高血压、血红蛋白、血清白蛋白、尿蛋白、推定肾小球滤过量(eGFR)、血清钙、血清磷、骨化三醇(1,25-二羟基维生素 D₃)、全长 1-84 甲状旁腺素(全长 PTH)、采血的季节、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂/血管紧张素受体拮抗剂(ARB)的给予、活性型维生素 D 给予、钙给予进行修正后的 Kaplan-Meier 生存曲线。

[0029] 图 5 为利用 25(OH)D 浓度与 FGF-23 浓度的组合对 4 组的与肾事件发病(血清肌酐倍增或透析导入)相关的风险的多变量分析的分析图。

具体实施方式

[0030] <肾功能衰竭的预后判断方法>

[0031] 本发明的肾功能衰竭的预后判断方法的特征在于,对生物体试样中的 FGF-23 及 25(OH)D 进行测定。本发明的肾功能衰竭的预后判断方法包含例如以下的工序。

[0032] [1]对生物体试样中的 FGF-23 进行测定的工序;

[0033] [2]将通过工序[1]得到的测定值与预先作成的表示 FGF-23 浓度与测定值之间的关系的标准曲线对照,确定生物体试样中的 FGF-23 浓度的工序;

[0034] [3]对生物体试样中的 25 (OH)D 进行测定的工序;

[0035] [4]将通过工序[3]得到的测定值与预先作成的表示 25 (OH)D 浓度与测定值之间的关系的标准曲线对照,确定生物体试样中的 25 (OH)D 浓度的工序;

[0036] [5]根据通过工序[2]确定的 FGF-23 浓度和通过工序[4]确定的 25 (OH)D 浓度,当 FGF-23 浓度为以针对供于测定的全部生物体试样的 FGF-23 浓度为基础确定的中央值以上、且 25 (OH)D 浓度小于以针对供于测定的全部生物体试样的 25 (OH)D 浓度为基础确定的中央值时,判断为肾功能衰竭的预后不良;当 FGF-23 浓度小于 FGF-23 中央值、且 25 (OH)D 浓度为 25 (OH)D 中央值以上时,判断为肾功能衰竭的预后良好的工序。

[0037] 在工序[5]中,当以针对供于测定的全部生物体试样的 FGF-23 浓度和 25 (OH)D 浓度为基础确定的 FGF-23 浓度的中央值、25 (OH)D 浓度的中央值例如分别为 49.4pg/mL、23.0ng/mL 时,可以将 FGF-23 浓度为 49.4pg/mL 以上且 25 (OH)D 浓度小于 23.0ng/mL 的受试者判断为肾功能衰竭的预后不良,将 FGF-23 浓度小于 49.4pg/mL 且 25 (OH)D 浓度为 23.0ng/mL 以上的受试者判断为肾功能衰竭的预后良好。

[0038] 这里,FGF-23 浓度的中央值是指当将针对全部生物体试样确定的 FGF-23 浓度从值较小的一侧依次排列时正好位于正中的 FGF-23 的浓度。同样地,25 (OH)D 浓度的中央值是指当将针对全部生物体试样确定的 25 (OH)D 浓度从值较小的一侧依次排列时正好位于正中的 25 (OH)D 的浓度。

[0039] 关于本发明中的生物体试样,只要是能够测定 FGF-23 和 25 (OH)D 的试样,则没有特别限制,可列举出例如全血、血清、血浆等,优选血清或血浆。

[0040] 作为 FGF-23 的测定方法,只要是能够测定 FGF-23 的方法,则没有特别限制,可列举出例如使用与 FGF-23 结合的抗体来进行测定的免疫学测定方法等。作为免疫学测定方法,只要是免疫测定法、免疫印迹法、凝集反应、补体结合反应、溶血反应、沉降反应、金胶体法、色谱法、免疫染色法等利用了抗原抗体反应的方法则包括所有的方法,但优选可列举出免疫测定法。

[0041] 免疫测定法是使用进行了各种标记的抗原或抗体对抗体或抗原进行检测或定量的方法,根据抗原或抗体的标记方法的不同,可列举出放射免疫测定法(RIA)、酶免疫测定法(EIA 或 ELISA)、化学发光酶免疫测定法(CLEIA 或 CLIA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法(luminescent immunoassay)、物理化学测定法(TIA、LAPIA、PCIA)、流式细胞法等,优选化学发光酶免疫测定法等。免疫测定法还可以是夹心法或者竞争法。

[0042] 使用免疫测定法测定生物体试样中的 FGF-23 可以采用例如以下的方法进行。

[0043] [1]将生物体试样中的 FGF-23 固定到载体上、且使其和与 FGF-23 结合的第 1 抗体或其片段、以及在与 FGF-23 结合的第 2 抗体或其片段上键合有标记的标记化第 2 抗体反应,从而在载体上形成由第 1 抗体、FGF-23、及标记化第 2 抗体构成的免疫复合物的工序;

[0044] [2]对形成的免疫复合物中的标记进行测定的工序;以及、

[0045] [3]将通过工序[2]得到的测定值与预先作成的表示 FGF-23 浓度与测定值之间的关系的标准曲线对照,从而确定生物体试样中的 FGF-23 浓度的工序。

[0046] 上述工序[1]与工序[2]之间还可以插入洗涤工序。

[0047] 关于标记,只要是能够与抗 FGF-23 抗体结合并用于 FGF-23 的测定的标记,则没有特别限制,可列举出例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、荧光物质、发光物质等。

[0048] 当使用过氧化物酶作为标记时,可以使用后述的标记测定用试剂对 FGF-23 进行测定。即,可以通过对免疫复合物中的标记(=过氧化物酶)与标记测定用试剂反应所产生的荧光、发光等进行测定,从而对 FGF-23 进行测定。

[0049] 当使用碱性磷酸酶作为标记时,可以使用后述的标记测定用试剂对 FGF-23 进行测定。即,可以通过对免疫复合物中的标记(=碱性磷酸酶)与标记测定用试剂反应所产生的荧光、发光等进行测定,从而对 FGF-23 进行测定。

[0050] 当使用 β -半乳糖苷酶作为标记时,可以使用后述的标记测定用试剂对 FGF-23 进行测定。即,可以通过对免疫复合物中的标记(= β -半乳糖苷酶)与标记测定用试剂反应所产生的荧光、发光等进行测定,从而对 FGF-23 进行测定。

[0051] 当使用荧光物质作为标记时,可以通过对来自免疫复合物中的标记(=荧光物质)的荧光进行测定,从而对 FGF-23 进行测定。作为荧光物质,可列举出例如 FITC (异硫氰酸荧光素)、RITC (罗丹明 B - 异硫氰酸酯)、量子点(quantum dot) (Science, 281, 2016-2018, 1998)、藻红蛋白等藻胆蛋白(phycoobilin protein)、GFP (绿色荧光蛋白)、RFP (红色荧光蛋白)、YFP (黄色荧光蛋白)、BFP (蓝色荧光蛋白)等。

[0052] 当使用发光物质作为标记时,通过测定来自免疫复合物中的标记(=发光物质)的发光,能够对 FGF-23 进行测定。作为发光物质,可列举出例如吖啶鎓及其衍生物、钆配位化合物、洛芬碱等。

[0053] 另外, FGF-23 的测定还可以使用市售的 FGF-23 测定试剂盒来进行。作为市售的 FGF-23 测定试剂盒,可列举出例如“FGF-23 测定试剂”(KAINOS 公司制)等。

[0054] 作为 25(OH)D 的测定方法,只要是能够测定 25(OH)D 的方法,则没有特别限制,可列举出例如使用抗 25(OH)D 抗体进行测定的免疫学测定方法等。作为免疫学测定方法,只要是免疫测定法、免疫印迹法、凝集反应、补体结合反应、溶血反应、沉降反应、金胶体法、色谱法、免疫染色法等利用了抗原抗体反应的方法,则所有方法均包含在内。作为 25(OH)D 测定方法,优选可列举出免疫测定法。

[0055] 作为免疫测定法,可列举出例如上文所述的测定法等。

[0056] 使用免疫测定法测定生物体试样中的 25(OH)D 例如可以按照以下的方法进行。

[0057] [1] 将生物体试样中的 25(OH)D 固定的载体上、且使其和与 25(OH)D 结合的第 1 抗体或其片段、以及在与 25(OH)D 结合的第 2 抗体或其片段上结合有标记的标记化第 2 抗体反应,从而在载体上形成由第 1 抗体、25(OH)D 及标记化第 2 抗体构成的免疫复合物的工序;

[0058] [2] 对形成的免疫复合物中的标记进行测定的工序;以及,

[0059] [3] 将通过工序[2]得到的测定值与预先作成的表示 25(OH)D 浓度与测定值之间的关系的标准曲线对照,从而确定生物体试样中的 25(OH)D 浓度的工序。

[0060] 上述工序[1]与工序[2]之间还可以插入洗涤工序。

[0061] 关于标记,只要是能够与抗 25(OH)D 抗体结合并能够测定 25(OH)D 的标记,则没有特别限制,可列举出例如上文所述的标记等。另外,25(OH)D 的测定还可以使用市售的 25(OH)D 测定试剂盒来进行。作为市售的 25(OH)D 测定试剂盒,可列举出例如“LIAISON25OH

Vitamin D TOTAL Assay” (DiaSorin 公司制)、“25-OH Vitamin D, Direct ELISA Kit” (Immundiagnostik 公司制) 等。

[0062] <肾功能衰竭的预后判断用试剂盒>

[0063] 本发明的肾功能衰竭的预后判断用试剂盒是用于本发明的肾功能衰竭的预后判断方法的试剂盒,其包含 FGF-23 测定试剂及 25 (OH) D 测定试剂。本发明的试剂盒中还可以进一步包含生物体试样的稀释液、反应缓冲液、洗涤液、标记物的检测用试剂等。另外,本发明的试剂盒还可以与适于测定的机器组合构成试剂盒。

[0064] (1) FGF-23 测定试剂

[0065] 作为 FGF-23 测定试剂,只要是能够测定生物体试样中的 FGF-23 的试剂,则没有特别限制,可列举出例如(1)固定在载体上、且含有与 FGF-23 结合的第 1 抗体及在与 FGF-23 结合的第 2 抗体上结合有标记的标记化第 2 抗体的试剂、(2)固定在载体上、且含有与 FGF-23 结合的抗体及在与 FGF-23 竞争的竞争物质上结合有标记的标记化竞争物质的试剂、(3)固定在载体上、且含有与 FGF-23 竞争的竞争物质及在与 FGF-23 结合的抗体上结合有标记的标记化抗体的试剂等。此外,FGF-23 测定试剂中根据需要还可以含有生物体试样的稀释液、反应缓冲液、洗涤液、标记检测用试剂、FGF-23 的标准物质等。

[0066] 作为与 FGF-23 结合的抗体(抗 FGF-23 抗体),只要是与 FGF-23 结合的抗体,则没有特殊限制,可列举出例如羊、兔、大鼠、小鼠等的抗 FGF-23 抗体等。抗 FGF-23 抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。另外,还可以使用抗 FGF-23 抗体的片段。作为抗体片段,可列举出例如将抗体用木瓜蛋白酶处理而得到的 Fab、通过胃蛋白酶处理而得到的 F(ab')₂、通过胃蛋白酶处理-还原处理而得到的除去了 Fab' 等的 Fc 部分的抗体片段等。当使用第 1 抗体和第 2 抗体时,第 1 抗体的抗原识别部位与第 2 抗体的抗原识别部位可以相同,也可以不同,优选不同。

[0067] 作为与 FGF-23 竞争的竞争物质,只要是能够与 FGF-23 竞争的物质,则没有特别限制,可列举出例如 FGF-23 自身、含有相当于抗 FGF-23 抗体的抗原识别部位的肽的物质等。

[0068] 作为载体,只要是能够用于测定 FGF-23 的载体,则没有特别限制,可列举出平板、乳胶、磁性粒子等。作为抗 FGF-23 抗体及竞争物质在载体上的固定,可列举出例如物理方法、化学方法等。作为物理方法,可列举出例如利用物理吸附的方法等。作为化学方法,可列举出例如利用抗生物素蛋白-生物素的相互作用的方法、利用接头的方法等。

[0069] 作为生物体试样的稀释液,只要是能够用于测定 FGF-23 的稀释液,则没有特别限制,可列举出例如在水性介质中含有表面活性剂、蛋白等的水溶液等。作为水性介质,可列举出例如脱离子水、蒸馏水、缓冲液等。作为缓冲液,可列举出例如磷酸缓冲液、Good's 缓冲液等。作为 Good's 缓冲液,可列举出例如 2- 吗啉代乙磺酸(MES)缓冲液、双(2- 羟基乙基)亚氨基三(羟基甲基)甲烷(Bis-Tris)缓冲液、三(羟基甲基)氨基甲烷(Tris)缓冲液、N-(2- 乙酰胺)亚氨基二乙酸(ADA)缓冲液、哌嗪-N,N'-双(2- 乙磺酸)(PIPES)缓冲液、2-[N-(2- 乙酰胺)氨基]乙磺酸(ACES)缓冲液、3- 吗啉代-2- 羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲液、2-[N,N-双(2- 羟基乙基)氨基]乙磺酸(BES)缓冲液、3- 吗啉代丙磺酸(MOPS)缓冲液、2-{N-[三(羟基甲基)甲基]氨基}乙磺酸(TES)缓冲液、N-(2- 羟基乙基)-N'-(2- 磺基乙基)哌嗪(HEPES)缓冲液、3-[N,N-双(2- 羟基乙基)氨基]-2- 羟基丙磺酸(DIPSO)缓冲液、2- 羟基-3-{[N-三(羟基甲基)甲基]氨基}丙磺酸(TAPSO)缓冲液、哌嗪-N,N'-双

(2- 羟基丙烷 -3- 磺酸) (POPSO) 缓冲液、N- (2- 羟基乙基) -N' - (2- 羟基 -3- 磺基丙基) 哌嗪 (HEPPSO) 缓冲液、N- (2- 羟基乙基) -N' - (3- 磺基丙基) 哌嗪 (EPPS) 缓冲液、[N- 三(羟基甲基) 甲基甘氨酸] (Tricine) 缓冲液、[N, N- 双(2- 羟基乙基) 甘氨酸] (Bicine) 缓冲液、3- [N- 三(羟基甲基) 甲基] 氨基丙磺酸 (TAPS) 缓冲液、2- (N- 环己基氨基) 乙磺酸 (CHES) 缓冲液、3- (N- 环己基氨基) -2- 羟基丙磺酸 (CAPSO) 缓冲液、3- (N- 环己基氨基) 丙磺酸 (CAPS) 缓冲液等。

[0070] 作为表面活性剂, 只要是能够用于测定 FGF-23 的表面活性剂, 则没有特别限制, 可列举出例如非离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂、阴离子性表面活性剂、两性表面活性剂等。作为蛋白, 可列举出例如牛血清白蛋白 (BSA)、胎牛血清 (FBS)、酪蛋白、BlockAce (大日本制药公司制) 等。

[0071] 作为反应缓冲液, 只要是能够用于测定 FGF-23 的缓冲液, 则没有特别限制, 可列举出例如上文所述的缓冲液等。反应缓冲液中根据需要还可以含有表面活性剂、蛋白、金属离子、糖类、防腐剂等。作为表面活性剂, 可列举出例如上文所述的表面活性剂等。作为蛋白, 可列举出例如上文所述的蛋白等。作为金属离子, 可列举出例如镁离子、锰离子、锌离子等。作为糖类, 可列举出例如甘露醇、山梨糖醇等。作为防腐剂, 可列举出例如叠氮钠、抗生素 (链霉素、青霉素、庆大霉素等)、BioAce 等。

[0072] 作为洗涤液, 只要是能够用于测定 FGF-23 的洗涤液, 则没有特别限制, 可列举出例如磷酸缓冲化生理盐水 (含有 0.15mol/L 氯化钠的 10mmol/L 磷酸缓冲液、pH 为 7.2) (PBS) 等。洗涤液中根据需要还可以含有上文所述的表面活性剂、蛋白、防腐剂等。

[0073] 标记测定用试剂是用于对通过抗原抗体反应生成的免疫复合物中的标记进行测定的试剂, 只要是能够用于测定 FGF-23 的标记测定用试剂, 则没有特殊限制。关于标记, 只要是与抗 FGF-23 抗体结合且能够用于测定 FGF-23 的标记, 则没有特别限制, 可列举出例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶等。标记测定用试剂中根据需要还可以含有上文所述的表面活性剂、蛋白、金属离子、糖类、防腐剂等。

[0074] 当使用过氧化物酶作为标记时, 作为标记测定用试剂, 可列举出例如含有过氧化氢和荧光底物的试剂、含有过氧化氢和发光底物的试剂等。通过对标记 (= 过氧化物酶) 与标记测定用试剂反应所产生的荧光、发光等进行测定, 能够对 FGF-23 进行测定。作为荧光底物, 可列举出例如 4- 羟基苯基乙酸、3- (4- 羟基苯基) 丙酸、香豆素等。作为发光底物, 可列举出例如鲁米诺 (luminol) 化合物、光泽精 (lucigenin) 化合物等。

[0075] 当使用碱性磷酸酶作为标记时, 作为标记测定用试剂, 可列举出例如含有碱性磷酸酶的底物的试剂等。通过对标记 (= 碱性磷酸酶) 与标记测定用试剂反应所产生的发光等进行测定, 能够对 FGF-23 进行测定。作为碱性磷酸酶的底物, 可列举出例如 3- (2'- 螺旋金刚烷) -4- 甲氧基 -4- (3'- 磷酰氧基) 苯基 -1, 2- 二氧杂环丁烷二钠盐 (AMPPD)、2- 氯 -5- {4- 甲氧基螺 [1, 2- 二氧杂环丁烷 -3, 2' - (5' - 氯) 三环 [3. 3. 1. 13, 7] 癸烷] -4- 基} 苯基磷酸二钠盐 (CDP-StarTM)、3- {4- 甲氧基螺 [1, 2- 二氧杂环丁烷 -3, 2' - (5' - 氯) 三环 [3. 3. 1. 13, 7] 癸烷] -4- 基} 苯基磷酸二钠盐 (CSPDTM)、[10- 甲基 -9 (10 H) -acridinylidene] 苯氧基甲基磷酸二钠盐 (LumigenTM APS-5)、9- (4- 氯苯基硫代磷酰氧基亚甲基) -10- 甲基吡啶酮二钠盐等。

[0076] 当使用 β -半乳糖苷酶作为标记时, 作为标记测定用试剂, 可列举出例如含有

β -半乳糖苷酶的底物的试剂等。通过对标记(= β -半乳糖苷酶)与标记测定用试剂反应所产生的荧光、发光等进行测定,能够对 FGF-23 进行测定。作为 β -半乳糖苷酶的底物,可列举出例如 4-甲基伞花基- β -D-半乳糖苷、Galacton-Plus [Applied Biosystems 公司制] 或它的类似化合物等。

[0077] 作为标准物质,可列举出通过基因重组技术获得的、或者从生物体试样获得的 FGF-23 或表达有 FGF-23 的细胞等。

[0078] (2) 25 (OH) D 测定试剂

[0079] 作为 25 (OH) D 测定试剂,只要是能够用于测定生物体试样中的 25 (OH) D 的试剂,则没有特别限制,可列举出例如(1) 固定在载体上、且含有与 25 (OH) D 结合的第 1 抗体及在与 25 (OH) D 结合的第 2 抗体结合有标记的标记化第 2 抗体的试剂、(2) 固定在载体上、且含有与 25 (OH) D 结合的抗体及在与 25 (OH) D 竞争的竞争物质上结合有标记的标记化竞争物质的试剂、(3) 固定在载体上、且含有与 25 (OH) D 竞争的竞争物质及在与 25 (OH) D 结合的抗体结合有标记的标记化抗体的试剂等。此外,25 (OH) D 测定试剂中根据需要还可以含有生物体试样的稀释液、反应缓冲液、洗涤液、标记检测用试剂、25 (OH) D 的标准物质等。

[0080] 作为与 25 (OH) D 结合的抗体(抗 25 (OH) D 抗体),只要是与 25 (OH) D 结合的抗体,则没有特殊限制,可列举出例如羊、兔、大鼠、小鼠等的抗 25 (OH) D 抗体等。抗 25 (OH) D 抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。另外,还可以使用抗 25 (OH) D 抗体的片段。作为抗体片段,可列举出例如上文所述的片段等。当使用第 1 抗体和第 2 抗体时,第 1 抗体的抗原识别部位与第 2 抗体的抗原识别部位可以相同,也可以不同,优选不同。

[0081] 作为与 25 (OH) D 竞争的竞争物质,只要是能够与 25 (OH) D 竞争的物质,则没有特别限制,可列举出例如 25 (OH) D 自身、或含有相当于抗 25 (OH) D 抗体的抗原识别部位的 25 (OH) D 分子中的部分结构的物质等。

[0082] 作为载体,只要是能够用于测定 25 (OH) D 的载体,则没有特别限制,可列举出例如上文所述的载体等。关于抗 25 (OH) D 抗体和竞争物质在载体上的固定,可列举出例如上文所述的固定化方法等。

[0083] 作为生物体试样的稀释液,只要是能够用于测定 25 (OH) D 的稀释液,则没有特别限制,可列举出例如上文所述的稀释液等。

[0084] 作为反应缓冲液,只要是能够用于测定 25 (OH) D 的缓冲液,则没有特别限制,可列举出例如上文所述的缓冲液等。反应缓冲液中根据需要还可以含有上文所述的表面活性剂、蛋白、金属离子、糖类、防腐剂等。

[0085] 作为洗涤液,只要是能够用于测定 25 (OH) D 的洗涤液,则没有特别限制,可列举出例如上文所述的洗涤液等。

[0086] 作为标记测定用试剂,只要是能够用于测定 25 (OH) D 的标记测定用试剂,则没有特别限制。关于标记,只要是能够与抗 25 (OH) D 抗体结合且用于测定 25 (OH) D 的标记,则没有特别限制,可列举出例如上文所述的标记等。作为标记测定用试剂,可列举出例如上文所述的标记测定用试剂等。标记测定用试剂中根据需要还可以含有上文所述的表面活性剂、蛋白、金属离子、糖类、防腐剂等。

[0087] 作为标准物质,可列举出从生物体试样制备的 25 (OH) D 或化学合成的 25 (OH) D

等。也可以使用市售的 25 (OH)D 作为标准物质。

[0088] 以下,通过实施例对本发明进行详细地说明,但这些实施例并不是用于对本发明的范围进行任何限定。

[0089] 实施例 1

[0090] <患者背景>

[0091] 从患有慢性肾病的注册进行大阪维生素 D 研究的患者中选择稳定期的慢性肾病患者 738 名,并获得了有关本研究的知情同意。大阪大学医学部附属医院的伦理委员会认可了本研究。从 2005 年 5 月至 2007 年 7 月进行患者注册,至 2010 年 7 月对经过实施观察。

[0092] <样品测定>

[0093] 在患者注册时对包括全血、血清或血浆在内的血液样品和尿样品进行采样,在 30 分钟内对血液样品进行离心分离,将得到的血清在 -80℃ 下冷冻保存直至测定。测定各种样品中的肌酐、白蛋白、钙和无机磷并算出 eGFR。eGFR 按照基于菊糖清除率的日本的标准方法估算。

[0094] 全长 1-84PTH 测定使用了 Scantibodies 公司制的全长 PTH 分析试剂盒。FGF-23 的测定使用了 KAINOS 公司制的试剂盒。骨化三醇的测定使用了 Immunodiagnostic Systems 公司制的 TFB1, 25-hydroxyvitamin D RIA kit。另外,25 (OH)D 的测定使用了 DiaSorin 公司制的 ¹²⁵I RIA kit。各测定按照各公司所附文件中记载的条件和方法实施。

[0095] (1) 多变量分析中的肾事件(血清肌酐倍增或透析导入)的风险比(Hazard ratios)及 95% 置信区间的研究

[0096] 使用患者基本信息以及各种测定值对肾事件发病的风险进行多变量分析。其结果示于图 1。图 1 为表示各种危险因子与风险比之间的关系图,各种危险因子的 3 个数值从左依次表示风险比、95% 置信区间的下限、95% 置信区间的上限。这里,风险比是表示当将无尿蛋白的组 [尿蛋白(-)] 作为对照组时、特定危险因子的组的肾事件发生高了几倍的值。另外,95% 置信区间是以 95% 的概率计包含人群平均在内的范围。

[0097] 从图 1 可清楚地确认,随着 25 (OH)D [25D] 达到 10ng/mL 高浓度 [25D (10ng/mL)]、随着年龄增加 10 岁 [年龄(10 岁)],女性 [性别(女性)]、血红蛋白高值(血红蛋白)、eGFR 为高值 [eGFR (10mL/min/1.73m²)] 的情况下,有肾病进展缓慢的倾向;另外确认了:在 FGF-23 为高值 (LogFGF-23)、心血管病疾患(现有 CVD)、高血压(收缩压)及尿蛋白为 3+ 以上 [尿蛋白 ≥ (3+)] 的情况下,有早期肾病进展的倾向。

[0098] (2) 25 (OH)D 及 FGF-23 的各组的肾事件的风险比及 95% 置信区间的研究

[0099] 将 25 (OH)D [25D] 浓度分为小于 10ng/mL、10ng/mL 以上且小于 20ng/mL、20ng/mL 以上且小于 30ng/mL、30ng/mL 以上这 4 组。另外,关于 FGF-23 [FGF23] 浓度,基于 31.7 ~ 80.5pg/mL 的浓度范围,将 FGF-23 从低浓度至高浓度依次分为 Q1 ~ Q5 这 5 组,分别研究了风险比(HR)及 95% 置信区间(95%CI)。其结果示于图 2。图 2 为表示各种危险因子与风险比之间的关系图,各种危险因子的括弧内的 3 个数值从左起表示风险比、95% 置信区间的下限、95% 置信区间的上限。

[0100] 关于 25 (OH)D [25D] 浓度,显示越是从高浓度向低浓度转移、肾事件的风险比越上升的倾向,即在最低的组(小于 10ng/mL)中为最高的风险比(HR 为 11.5)。

[0101] 关于 FGF-23 [FGF23] 浓度,可见向着高浓度组一侧、肾事件的风险比增加的倾向,

对于 Q2 组、Q3 组、Q4 组、Q5 组,显示 FGF-23 浓度越高的组、风险比越高。

[0102] (3) 25 (OH)D 及 FGF-23 的各组合组的肾事件的 Kaplan-Meier 生存曲线的研究

[0103] 全部对象的 25(OH)D 浓度的中央值为 23.0ng/mL、FGF-23 浓度的中央值为 49.4pg/mL,因此将 25 (OH)D 浓度小于 23.0ng/mL 的作为低值组、将 23.0ng/mL 以上的作为高值组。另外,将 FGF-23 浓度小于 49.4pg/mL 的作为低值组、将 49.4pg/mL 以上的作为高值组,将各组合分类为 25 (OH)D 浓度低值且 FGF-23 浓度低值组(df 组)、25 (OH)D 浓度高值且 FGF-23 浓度低值组(Df 组)、25 (OH)D 浓度低值且 FGF-23 浓度高值组(dF 组)、25 (OH)D 浓度高值且 FGF-23 浓度高值组(DF 组)这 4 组,制成约 5 年间中的肾事件(血清肌酐倍增或透析导入)的 Kaplan-Meier 生存曲线。这里的 Kaplan-Meier 生存曲线是表示 4 组的各组在未发生肾事件的情况下生存概率与天数之间的关系的曲线。

[0104] 将基于用年龄、性别、糖尿病、心血管病疾患、高血压、血红蛋白、血清白蛋白、尿蛋白、eGFR、血清钙、血清磷、骨化三醇、全长 PTH、采血的季节、ACE 抑制剂 / ARB 的给予、活性型维生素 D 给予、钙给予进行修正前的数据的 Kaplan-Meier 生存曲线示于图 3,将基于修正后的数据的 Kaplan-Meier 生存曲线示于图 4。

[0105] 从图 3 及图 4 可清楚地确认,在修正前及修正后的任一数据中,25 (OH)D 低值且 FGF-23 高值组(dF 组)的肾事件发病显著性地多。

[0106] (4) 25 (OH)D 与 FGF-23 的各组合组的肾事件的风险比及 95% 置信区间的研究

[0107] 研究前项的 25 (OH)D [25D] 与 FGF-23 [FGF23] 的 4 个组合组的肾事件的风险比及 95% 置信区间。其结果示于图 5。

[0108] 如图 5 所示地确认了,以 25 (OH)D 浓度高值且 FGF-23 浓度低值组(Df 组)为基准,25 (OH)D 浓度低值且 FGF-23 浓度低值组(df 组)的风险比(HR)和 95% 置信区间(95%C. I.)分别为 1.47、0.63 ~ 3.43、25 (OH)D 浓度高值且 FGF-23 浓度高值组(DF 组)的风险比(HR)和 95% 置信区间(95%C. I.)分别为 1.96、0.88 ~ 4.36、25 (OH)D 浓度低值且 FGF-23 浓度高值组(dF 组)的风险比(HR)和 95% 置信区间(95%C. I.)分别为 2.53、1.14 ~ 5.64。因此确认了,25 (OH)D 浓度低值且 FGF-23 浓度高值组(dF 组)的肾事件的风险最高。

[0109] 产业上的可利用性

[0110] 通过本发明,能够提供对于确定肾功能衰竭患者的治疗方针有用的肾功能衰竭的预后判断方法及肾功能衰竭的预后判断用试剂盒。

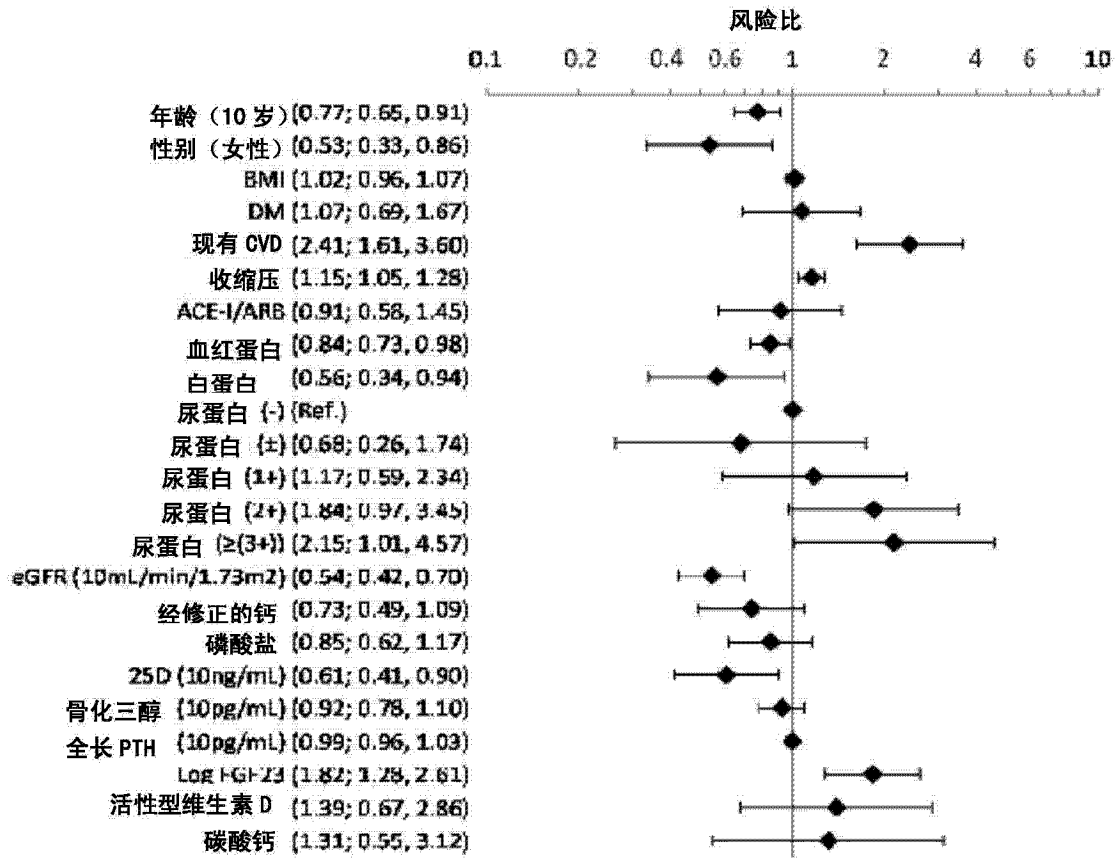


图 1

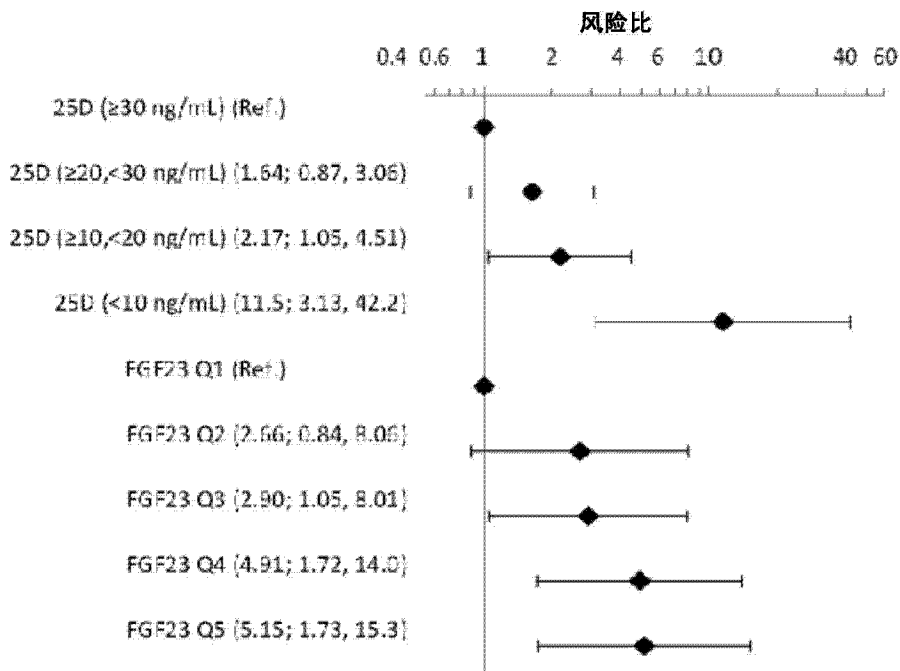


图 2

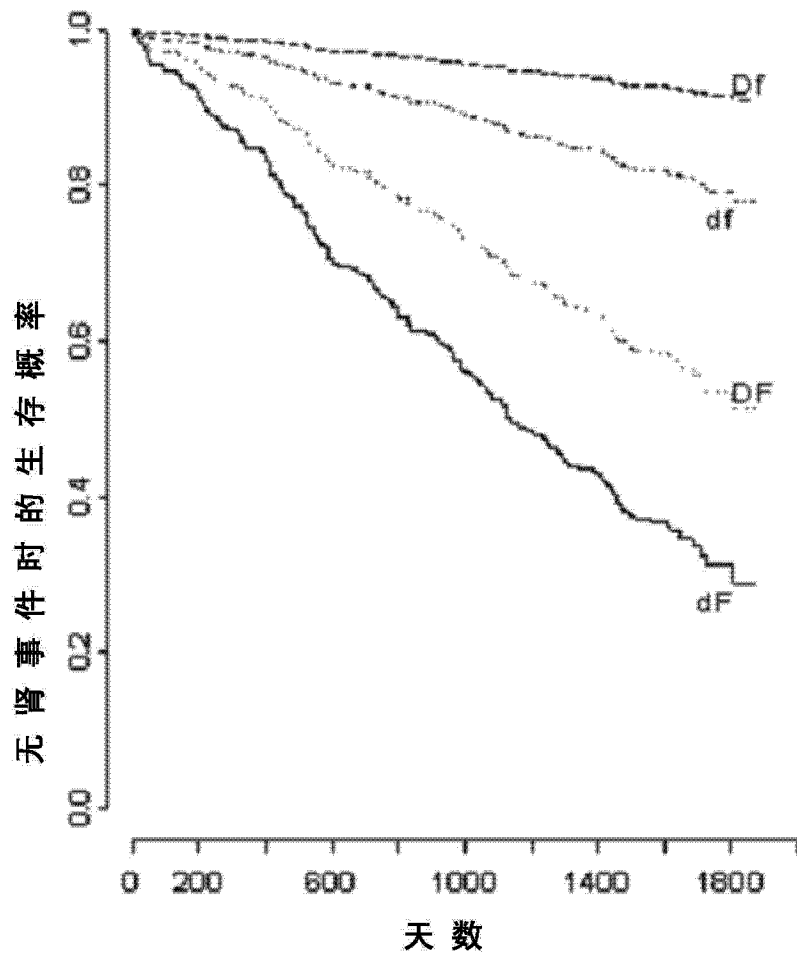


图 3

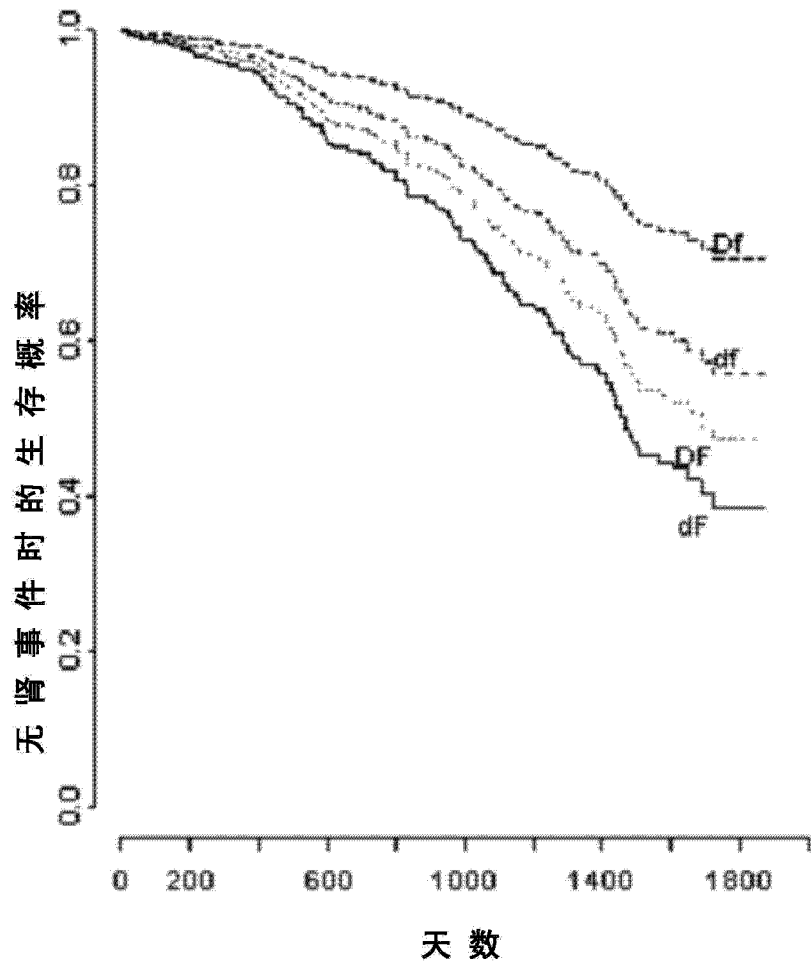


图 4

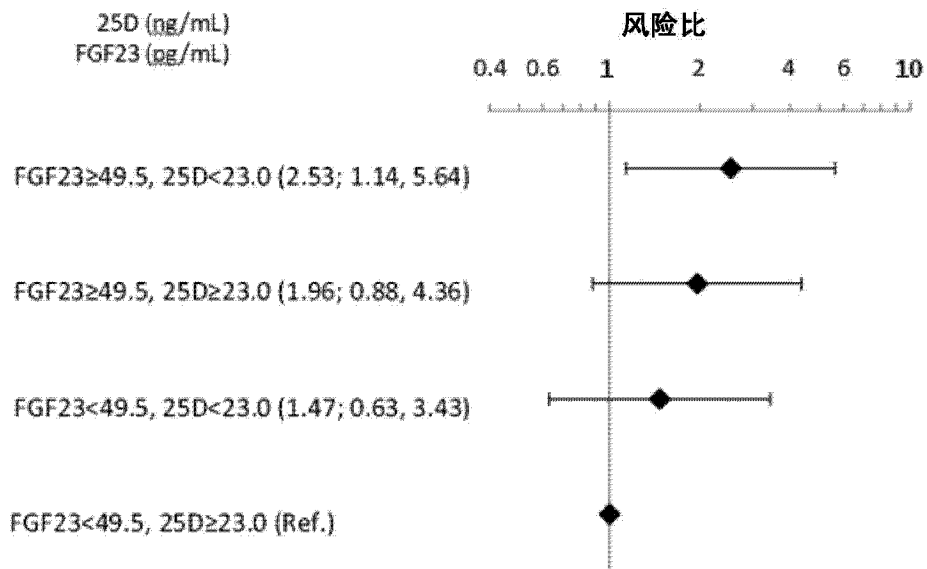


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 肾功能衰竭的预后判断方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103608676A | 公开(公告)日 | 2014-02-26 |
| 申请号 | CN201280028543.3 | 申请日 | 2012-04-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 协和梅迪克斯株式会社 | | |
| [标]发明人 | 滨野高行 猪阪善隆 松井功 | | |
| 发明人 | 滨野高行 猪阪善隆 松井功 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/74 G01N33/82 G01N2333/50 G01N2800/52 G01N2800/347 G01N33/6893 G01N2800/50 | | |
| 代理人(译) | 白丽 | | |
| 优先权 | 2011096718 2011-04-25 JP | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及肾功能衰竭的预后判断方法和肾功能衰竭的预后判断用试剂盒，所述肾功能衰竭的预后判断方法的特征在于，对生物体试样中的成纤维细胞生长因子-23及25羟化维生素D进行测定；所述肾功能衰竭的预后判断用试剂盒的特征在于，包含成纤维细胞生长因子-23测定试剂及25羟化维生素D测定试剂。通过本发明，能够提供对于确定给药的选定、更严密的饮食疗法、早期透析导入等治疗方针有用的肾功能衰竭的预后判断方法及肾功能衰竭的预后判断用试剂盒。

