

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680005081.8

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008年2月6日

[11] 公开号 CN 101120019A

[22] 申请日 2006.3.31

[21] 申请号 200680005081.8

[30] 优先权

[32] 2005.4.5 [33] JP [31] 108623/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/306906 2006.3.31

[87] 国际公布 WO2006/109599 日 2006.10.19

[85] 进入国家阶段日期 2007.8.16

[71] 申请人 株式会社 JMS

地址 日本广岛县

[72] 发明人 山本敬史 木村祐子

[74] 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所  
代理人 刘新宇 李茂家

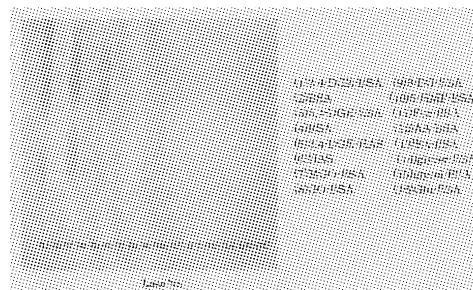
权利要求书 4 页 说明书 26 页 附图 9 页

## [54] 发明名称

对 3,4 - DGE 来源的 AGEs 特异性反应的抗体

## [57] 摘要

本发明提供与蛋白质或肽的反应性强的羰基化合物来源的 AGEs 抗体，以及提供所述羰基化合物来源的 AGEs 的检测方法。使 3,4 - 二脱氧葡萄糖醛酮 - 3 - 烯 (3,4 - DGE) 与蛋白质反应，将其反应产物 AGEs 免疫致敏在宿主动物中，从所述宿主动物身上回收血清，从该血清分离出抗所述反应产物 AGEs 的抗体 (抗 AGEs 抗体)。将该分离出的抗 AGEs 抗体与试样反应，检测所述试样中的 AGEs 与抗 AGEs 抗体的抗原抗体反应，从而可以检测所述试样中的 AGEs 的有无或含量。



1. 抗AGEs抗体，其特征在于，其为抗晚期糖基化终末产物（AGEs: advanced glycation endproducts）的抗体，所述AGEs为3,4-二脱氧葡萄糖醛酮-3-烯（3,4-DGE）与蛋白质或肽的反应产物。

2. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，其与选自甲基乙二醛（MGO）、乙二醛（GO）、3-脱氧葡萄糖醛酮（3-DG）、5-羟甲基糠醛（5-HMF）、糠醛（Fur）、甲醛（FA）、葡萄糖（Glu）和乙醛（AA）的至少一种羰基化合物和蛋白质或肽的反应产物不反应。

3. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，其与具有戊糖素残基和羧甲赖氨酸（CML）残基中至少一种残基的蛋白质或肽不反应。

4. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，其中所述AGEs为通过在25~50℃下孵育3,4-DGE与蛋白质或肽而获得的反应产物。

5. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，所述蛋白质为血清白蛋白。

6. 根据权利要求5所述的抗AGEs抗体，所述血清白蛋白为选自兔血清白蛋白、牛血清白蛋白和人血清白蛋白中的至少一种白蛋白。

7. 根据权利要求6所述的抗AGEs抗体，所述AGEs是如下获得的反应产物：对于蛋白质，以3,4-DGE达到所述蛋白质的氨基的2.5当量的量添加3,4-DGE，在37℃下孵育3天后，再以达到所述蛋白质的氨基的2.5当量的量添加3,4-DGE，在37℃下孵育4天。

8. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，其中抗体为多克隆抗体。

9. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，其中抗体为单克隆抗体。

10. 根据权利要求1所述的抗AGEs抗体，其中抗体是通过将所述AGEs作为抗原使宿主动物免疫致敏后，从所述动物的血液或腹水分离所获得的抗体。

11. 根据权利要求10所述的抗AGEs抗体，其中所述宿主动物为兔子。

12. AGEs检测方法，其特征在于，其为使试样和抗AGEs的抗AGEs抗体反应，通过所述试样中的AGEs与抗AGEs抗体的抗原抗体反应来检测所述试样中的AGEs的方法，

其中，所述AGEs为3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物，所述抗AGEs抗体为权利要求1所述的抗AGEs抗体。

13. 根据权利要求12所述的AGEs检测方法，其通过选自酶免疫测定法、放射免疫测定法、胶乳凝集法和金溶胶颗粒法中的至少一种免疫学方法检测所述抗原抗体反应。

14. 羰基化合物的检测方法，该方法为使用抗AGEs的抗AGEs抗体，检测生成所述AGEs的试样中的羰基化合物的方法，

所述羰基化合物为3,4-DGE，所述AGEs是3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物，所述抗AGEs抗体为权利要求1所述的抗AGEs抗体，

该检测方法包含以下工序：

使所述试样中的3,4-DGE与蛋白质或肽反应的工序；

使所述反应生成的产物与所述抗AGEs抗体反应的工序；

通过所述产物与所述抗AGEs抗体的抗原抗体反应检测所生成的AGEs的工序；以及，

由所述AGEs的有无或量，对试样中的3,4-DGE进行定性或定量的工序。

15. 根据权利要求14所述的羰基化合物的检测方法，其通过选自酶免疫测定法、放射免疫测定法、胶乳凝集法和金溶胶颗粒法中的至少一种免疫学方法检测所述抗原抗体反应。

16. 根据权利要求14所述的羰基化合物的检测方法，所述试样为透析液、点滴液、注射液、食品或体液。

17. 免疫试剂，其特征在于，该免疫试剂包含抗AGEs的抗AGEs抗体，所述AGEs是3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物，所述抗AGEs抗体为权利要求1所述的抗AGEs抗体。

18. 根据权利要求17所述的免疫试剂，其为用于检测AGEs的试剂，所述AGEs为3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物。

19. 根据权利要求17所述的免疫试剂，其为用于检测3,4-DGE的试剂。

20. 抗AGEs抗体的制造方法，其特征在于，其为抗晚期糖基化终末产物（AGEs: advanced glycation endproducts）的抗体的制造方法，所述AGEs为3,4-二脱氧葡萄糖醛酮-3-烯（3,4-DGE）与蛋白质或肽的反应产物，该制造方法包含以下工序：将所述AGEs作为抗原，将人以外的宿主动物免疫致敏的工序；回收由所述免疫致敏生成的抗所述AGEs的抗体的工序。

21. 根据权利要求20所述的抗AGEs抗体的制造方法，其包括在25~50℃下孵育3,4-DGE与蛋白质或肽而生成所述AGEs的工序。

22. 根据权利要求20所述的抗AGEs抗体的制造方法，所述蛋白质为血清白蛋白。

23. 根据权利要求22所述的抗AGEs抗体的制造方法，所述血清白蛋白为选自兔血清白蛋白、牛血清白蛋白和人血清白蛋白中的至少一种白蛋白。

24. 根据权利要求20所述的抗AGEs抗体的制造方法，所述

AGEs的生成工序是如下工序：对于蛋白质，以3,4-DGE达到所述蛋白质的氨基的2.5当量的量添加3,4-DGE，在37℃下孵育3天后，再以达到所述蛋白质的氨基的2.5当量的量添加3,4-DGE，在37℃下孵育4天，从而生成AGEs。

25. 根据权利要求20所述的抗AGEs抗体的制造方法，所述回收工序是从免疫致敏的所述宿主动物的血液或腹水分离抗体的工序。

26. 根据权利要求20所述的抗AGEs抗体的制造方法，所述宿主动物为兔子。

## 对 3,4-DGE 来源的 AGEs 特异性反应的抗体

### 技术领域

本发明涉及抗晚期糖基化终末产物 (AGEs: advanced glycation endproducts) 的抗体以及使用了该抗体的 AGEs 检测方法。

### 背景技术

蛋白质糖基化反应 (梅拉德反应) 是氨基酸、肽、蛋白质的氨基与酮、醛 (特别是还原糖) 的非酶反应, 分为前期阶段和后期阶段的 2 个反应。前期阶段的反应为可逆反应, 例如氨基与还原糖发生反应形成希夫碱, 接着通过分子内重排反应形成阿马道里化合物为止的反应。另一方面, 后期阶段的反应是不可逆反应, 前述阿马道里化合物经过重排、缩合等复杂的反应过程, 形成称为晚期糖基化终末产物 (AGEs) 的稳定物质。作为前述 AGEs, 例如已知有羧甲赖氨酸 (CML)、戊糖素、吡咯素、交联素等, 但认为生物体内还存在多种结构不明确的未知 AGEs。

近年来, 前述梅拉德反应的产物在医学领域中备受关注, 发表了其与各种疾病、疾患、老化的相关性。其中已知的是, 公知的 AGEs 不仅降低蛋白质的功能, 而且还诱发细胞障碍性反应、炎症反应, 而且, 还认为由于 AGEs 的形成, 蛋白质发生凝集、不溶而在组织中异常地蓄积, 由此使组织变性。另外, 糖尿病患者的血红蛋白 A1C (前期反应的阿马道里化合物) 的上升、AGEs 在糖尿病性肾病、慢性肾功能不全的肾脏、动脉硬化病变部位的蓄积被认为是生物体内蛋白质糖基化反应的代表例。

在测定上述梅拉德反应产物时，除了高效液相色谱法、气相色谱法之外，还已知免疫学的测定方法。其中，由于简便且不需要特殊分析仪器等理由，免疫学检测方法，具体为免疫组织学方法、酶免疫学测定方法等在医学领域的研究、临床诊断中被广泛使用。由此，制作了各种与糖基化蛋白质、AGEs特异性反应的抗体。具体地，制备了抗CML、戊糖素、交联素、吡咯素的抗体，报道了对老化、糖尿病、肾病等患病动物的组织的免疫学研究（例如非专利文献1、非专利文献2、非专利文献3、非专利文献4、非专利文献5）。另外，还报告了利用抗CML抗体作为糖尿病标记的方法（专利文献1），还报告了作为AGEs的N $\delta$ -(5-羟基-4,6-二甲基嘧啶-2-基)鸟氨酸的单克隆抗体（专利文献2）。

另外，已确认在所述梅拉德反应的前期阶段、生物体内的糖类代谢分解、还原糖的热分解等过程中，还原糖发生分解并生成3-脱氧葡萄糖醛酮（3-DG）、甲基乙二醛、乙二醛等羰基化合物。报告指出这些3-DG、甲基乙二醛、乙二醛与蛋白质的反应性强，是与前述AGEs生成密切相关的有效的中介体（以下也称为“AGEs前体”）。而且，来自于这些羰基化合物的AGEs大量地存在于血液透析患者的血液内，因此推测其与透析并发症有关（非专利文献6、非专利文献7）。

这样，还原糖的分解产物作为产生AGEs的原因物质备受关注，正被进行研究。但是，还原糖的分解途径很复杂，虽然已知生成多种多样的羰基化合物，而实际上何种羰基化合物与AGEs的生成相关、并且来自于这些羰基化合物的AGEs还有很多未被确认。因此，以AGEs定量为代表的AGEs的研究中，通常利用结构明确的AGEs、特别是用CML代为使用。

非专利文献1: Schleicher, E. D. et al., J. Clin. Invest. 99, 457,

1997

非专利文献2: Sanaka, T. et al., Nephron 91, 64, 2002

非专利文献3: Obayashi, H. et al., Biochem. Biophys. Res Commun. 226, 37, 1996

非专利文献4: Miyata, S. and Monnier, V., J. Clin. Invest. 89, 1102, 1992

非专利文献5: Hayase, F. et al., J. Biol. Chem. 263, 3758, 1989

非专利文献6: 竹内正义等, 日本临床60卷、增刊号8、2002年、日本临床社

非专利文献7: Takeuchi, M. et al., Molecular Medicine 7, 783, 2001

专利文献1: 日本特开平9-178740号公报

专利文献2: 日本特开平11-246599号公报

## 发明内容

### 发明需要解决的技术问题

因此, 在医疗领域中寻求对蓄积在生物体内并具有生物活性的能够成为各种疾病、疾患原因的新型AGEs进行分析和测定的方法。

因此, 本发明的目的在于特别指定与蛋白质、肽的反应性强、即AGEs产生能力高的羰基化合物, 并提供来自于前述羰基化合物的AGEs的抗体, 以及提供使用了前述抗体的前述AGEs的检测方法。

### 用于解决技术问题方法

本发明的抗体的特征在于, 其为抗晚期糖基化终末产物(AGEs)的抗体, 所述AGEs是3,4-二脱氧葡萄糖醛酮-3-烯

(3,4-DGE)与蛋白质或肽的反应产物。

#### 发明的效果

本发明人等反复进行了深入研究,结果发现与公知的AGEs前体(即,成为蛋白质等的AGEs化原因物质的羰基化合物等)相比,由葡萄糖产生的羰基化合物(3,4-DGE)与蛋白质的反应性极高,对生物体机能产生很大影响。而且,基于该见解,制造了抗前述3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物的抗体,从而完成了本发明。这样,由于本发明的抗体为特异性地识别3,4-DGE和蛋白质等的反应产物的抗体,因此能够高效地检测被认为对生物体机能具有很大影响的3,4-DGE来源的AGEs。因而,认为对被推测为与前述3,4-DGE来源的AGEs相关的后述各种疾患的诊断、治疗有用。

#### 附图说明

图1为本发明的实施例中用于求出抗3,4-DGE-RSA抗体的结合常数的曲线图。

图2(A)和(B)为显示本发明另一实施例的抗3,4-DGE-RSA抗体的反应特异性的曲线图。

图3为显示本发明的另一实施例的抗3,4-DGE-RSA抗体的蛋白质印迹结果的照片。

图4为显示本发明的另一实施例中将人腹膜间皮细胞暴露于3,4-DGE后,与抗3,4-DGE-RSA抗体进行抗原抗体反应的结果的照片,(a)为对照组的结果,(b)和(c)为实施例的结果。

图5为显示本发明的另一实施例中将大鼠腹腔暴露于透析液后,与抗3,4-DGE-RSA抗体进行抗原抗体反应的结果的照片,(A)为对照组的结果,(B)为使用含 $2\mu\text{M}$  3,4-DGE透析液的结果,(C)为使用含 $58\mu\text{M}$  3,4-DGE透析液的结果。

图6(A)和(B)为显示本发明的另一实施例中抗3,4-DGE-RSA抗体的反应特异性的曲线图。

图7为用于求出前述实施例中抗3,4-DGE-RSA抗体的结合常数的曲线图。

图8为显示本发明的另一实施例中抗3,4-DGE-RSA抗体与3,4-DGE以及蛋白质的反应时间不同的AGEs化蛋白质的反应性的曲线图。

图9为显示本发明的参考例中3,4-DGE和蛋白质的反应液的呈色的照片。

图10为显示前述参考例中3,4-DGE和蛋白质的反应中荧光强度随时间的变化的曲线图。

图11为显示前述参考例中,3,4-DGE和蛋白质的反应产物中Arg残基和Lys残基残存率的随时间变化的曲线图,(A)为Arg残基的残存率、(B)为Lys残基的残存率。

图12为显示前述参考例中,3,4-DGE和蛋白质的反应产物的等电点随时间变化的曲线图。

图13为显示前述参考例中,3,4-DGE和蛋白质的反应产物的SDS-PAGE随时间变化的曲线图,(A)为3,4-DGE的结果,(B)为MGO的结果。

图14为显示本发明的另一参考例中各种羰基化合物对蛋白质的反应性的曲线图。

图15为显示本发明的另一参考例中各种羰基化合物和蛋白质的产物的细胞毒性的曲线图。

图16为显示本发明的另一实施例的抗3,4-DGE-RSA抗体的蛋白质印迹结果的照片。

图17为显示本发明的另一实施例的抗3,4-DGE-RSA抗体的蛋白质印迹结果的照片。

## 具体实施方式

如上所述，本发明的抗AGEs抗体为抗3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物AGEs的抗体。

本发明的抗AGEs抗体优选不与如下物质反应：为作为公知的AGEs前体的甲基乙二醛（MGO）、乙二醛（GO）、3-脱氧葡萄糖醛酮（3-DG）、5-羟甲基糠醛（5-HMF）、糠醛（Fur）、甲醛（FA）、葡萄糖（Glu）、乙醛（AA）等羰基化合物来源的AGEs，特别是前述羰基化合物与蛋白质或肽的反应产物。而且，本发明的抗AGEs抗体优选不与作为公知AGEs的具有戊糖素残基和羧甲赖氨酸（CML）残基中至少一种残基的蛋白质或肽反应。

以下说明本发明的抗AGEs抗体的制备方法之一例。

### （1）作为抗原（免疫原）的AGEs的制备

通过使3,4-DGE和蛋白质（或肽，以下相同）发生梅拉德反应，从而制备AGEs。如在后述的参考例1中所示，相比于参与AGEs化的甲基乙二醛（MGO）、乙二醛（GO）、3-脱氧葡萄糖醛酮（3-DG）等公知的AGEs前体，3,4-DGE对蛋白质的反应性极高。因此如果混合3,4-DGE和蛋白质进行孵育，则3,4-DGE导致蛋白质发生AGEs化，获得反应产物AGEs。

AGEs化的有无通常可通过3,4-DGE与蛋白质的反应液是否呈褐色来判断，其发展可以通过褐色的浓度变化进行判断。另外，对于前述反应液的褐色化，在后面的参考例中说明（参照图9）。另外，通过3,4-DGE带来的蛋白质的AGEs化，反应产物呈现荧光，因此还可以通过例如荧光强度来判断AGEs的有无。荧光强度的测定条件没有特别限定，例如激发波长为320~370nm、荧光波长为400~470nm，优选激发波长为345nm、荧光波长为425nm。

使3,4-DGE发生梅拉德反应的蛋白质没有任何限制，例如

可以举出血清白蛋白等白蛋白、血红蛋白、肌红蛋白、血蓝蛋白等，其来源也可以举出例如兔子、牛、人等各种哺乳类，鸡、鹤鹑等各种鸟类等。作为具体例子例如可以举出RSA（兔血清白蛋白）、BSA（牛血清白蛋白）、HSA（人血清白蛋白）、卵清蛋白等。另外，肽可以是天然肽、合成肽的任一种，还可以是寡肽和多肽。

所制作的抗体可以与反应程度（例如3,4-DGE的添加量）无关地检测出3,4-DGE来源的AGEs。为了使制备抗原时的蛋白质完全AGEs化，例如必须添加相对于蛋白质的NH<sub>2</sub>基为等量以上的3,4-DGE，例如优选以相对于蛋白质的氨基达到0.1~100当量、更优选为1~10当量、特别优选为3~5当量的量添加3,4-DGE。另外，为了充分地进行AGEs化，还可以进行2次以上对蛋白质添加3,4-DGE。

3,4-DGE和蛋白质的孵育温度没有特别限制，例如为25~50℃、优选为35~40℃，每次的孵育时间也没有特别限制，例如为3~14天、优选为7~10天。

3,4-DGE和蛋白质的反应通常优选在缓冲液中进行，其pH值例如为6~8、优选为7~7.5。缓冲液的种类、浓度没有特别限制，可以根据所需的pH选择，例如可以举出磷酸缓冲液、马来酸氢钠-NaOH缓冲液等，优选其中不含氨基。反应液的缓冲液浓度也没有特别限制，例如为10~500mM的范围。

前述反应液中还可以添加二亚乙基三胺五乙酸（DTPA）等螯合剂，其浓度例如为1~100mM的范围。

如果蛋白质通过3,4-DGE发生AGEs化时，则反应产物AGEs通常发出荧光或者产生褐色。因此，例如如上所述地通过目测观察反应产物或者测定荧光强度可以确认有无AGEs化。

所得的反应产物（AGEs）通常为了脱盐、除去低分子化合

物（例如未反应3,4-DGE等），优选进行透析并过滤除菌后，用作免疫原。

## （2）抗体的制备

抗体的制备方法没有任何限制，例如通过进行对动物的免疫致敏而产生抗体的现有公知的方法，可以制备多克隆抗体和单克隆抗体。使发生免疫致敏的宿主动物的种类没有特别限定，例如可以使用人；兔子、大鼠、小鼠、山羊、绵羊、马、猪、豚鼠等人以外的哺乳动物；鸡、鸽子、鸭子、鹌鹑等鸟类等。另外，抗原的给药途径也没有特别限制，可以采用皮内给药、皮下给药、腹腔内给药、静脉内给药、肌肉内给药等，优选皮下给药、腹腔内给药、静脉内给药，更优选皮下给药。

例如，当制备多克隆抗体时，可以将前述抗原（AGEs）给药到前述宿主动物进行免疫，从回收的血清、腹水液等中分离提纯抗AGEs抗体。另外，当制备单克隆抗体时，例如将免疫的宿主动物的脾脏细胞、淋巴样细胞等抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤，使前述杂交瘤增殖，将产生具有特异性的抗体的杂交瘤细胞分离，从而可以获得单克隆抗体。

多克隆抗体和单克隆抗体的提纯方法没有任何限制，例如可以通过盐析、透析、离子交换色谱法、亲和色谱法、电泳等现有公知的方法进行。

另外，筛选产生的目标抗体的方法没有特别限制，可以采用现有公知的放射免疫分析（RIA）法、酶免疫分析（EIA）法等。

如此获得的抗体的免疫球蛋白通常为IgM或IgG。另外，所得抗体分子可以将其本身用作抗体，还可以将进一步通过酶处理获得的Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>等抗体的活性片段用作本发明的抗体。

接着，说明使用本发明的抗体检测3,4-DGE与蛋白质（或肽）的反应产物AGEs的方法。本发明的特征在于，是使试样和抗AGEs的抗AGEs抗体反应，通过前述试样中的AGEs与抗AGEs抗体的抗原抗体反应检测前述试样中的AGEs的方法，前述AGEs是3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物，前述抗AGEs抗体是前述本发明的抗AGEs抗体。

如果使用这种检测方法，可以检测各种试样中由3,4-DGE产生的AGEs。如上所述，3,4-DGE对蛋白质等的反应性极高，其自身和所生成的AGEs对细胞的毒性也强。因此认为，如果将检测这种3,4-DGE来源AGEs的本发明方法利用在例如临床医学等中，则对于诊断、预防被认为受到3,4-DGE来源AGEs影响的疾患有用。作为具体例子，通过检测3,4-DGE来源AGEs，可对与糖尿病、肾功能不全病症相关的各种疾患；糖尿病、肾功能不全的并发症；伴随老化的疾患；伴随着腹膜透析的腹膜纤维症、腹膜硬化症和硬化性包裹性腹膜硬化症等并发症等的发病可能性、发病程度、发展程度等进行判断。

前述抗原抗体反应例如可以通过免疫凝集法等检测，如EIA法（例如竞争性EIA法、间接EIA法）、RIA法、荧光免疫测定法（FIA）、化学发光免疫测定法（CLIA）、免疫比浊法（TIA）、胶乳免疫比浊法（LTIA）、金溶胶颗粒法等。例如，使抗AGEs抗体与试样（含有抗原AGEs的试样）反应，将该反应液添加到预先固定有抗原AGEs的载体中。这里，在前述反应液中未与试样中抗原反应的抗体与前述固定化抗原AGEs相结合。接着，从前述载体中除去前述反应液，添加抗前述抗AGEs抗体的标记化抗体（二抗）。由此，使前述二抗与结合在固定化抗原AGEs的抗AGEs抗体相结合，检测最终结合的前述二抗的标记即可。

前述载体没有特别限制，例如可以举出小球、板（例如免

疫板)、管等。另外,作为前述标记,例如可以举出过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶,荧光物质,发光物质,放射性同位素等。

抗体的标记化可以根据标记的种类通过常规方法进行。前述标记例如为酶时,添加因酶反应而显色的底物,通过吸光度等测定前述底物的显色程度即可。另外,为放射性同位素时,例如可以利用闪烁计数器测定放射活性。这种吸光度、放射活性、荧光强度等与结合在固定化抗原上的抗体量有相对关系,因此,例如可以使用预先准备的标准曲线等对抗体量进行定量。另外,结合在固定化抗原上的抗体量是不与试样中的抗原反应的游离抗体。因此,可以从游离的抗体量求出与试样中的与抗原相结合的抗体,由于其与试样中所含抗原相等,因此还能够定量前述试样中的抗原AGEs。另外,抗原抗体反应的检测方法不受这些方法任何限定,可以采用现有公知的方法。

该检测方法的被检试样没有特别限制,可以举出各种试样,例如血清、血浆、血液、尿、脊髓液等体液,生物细胞的提取液,菌体等培养液等。另外,本发明的检测方法还可以直接对生物组织进行。

接着,说明使用本发明的抗体检测生成AGEs的羰基化合物的方法。本发明的羰基化合物的检测方法的特征在于,是使用抗AGEs的抗AGEs抗体,检测生成所述AGEs的试样中的羰基化合物的方法,所述羰基化合物为3,4-DGE,所述AGEs是3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产物,所述抗AGEs抗体为所述本发明的抗AGEs抗体,该检测方法包含以下工序:使所述试样中的3,4-DGE与蛋白质或肽反应的工序;使所述反应生成的产物与所述抗AGEs抗体反应的工序;通过所述产物与所述抗AGEs抗体的抗原抗体反应检测所生成的AGEs的工序;由所述AGEs的有无或量,对试样中的3,4-DGE进行定性或定量的工序。

如上所述，3,4-DGE本身或者由此生成的AGEs对于细胞的毒性强。因此，例如，透析液等中含有3,4-DGE时，则在给药了这些物质的生物体中产生3,4-DGE来源的AGEs、有可能对生物体产生影响。通过本发明的3,4-DGE的检测方法，例如可以确认（定性）前述透析液等试样中的3,4-DGE存在，或对其含量进行定量，因此可以评价其是否是危险性低的透析液，可以说是在医疗方面极为有用的品质的判断方法。

作为适用本发明的羰基化合物检测方法的被检试样，没有特别限制，例如可以举出前述的透析液、点滴液、注射液、饮料等食品类等。特别是透析液、点滴液通常含有糖类，通过用于灭菌的加热处理，其成分有时会变为与AGEs化相关的物质（AGEs前体）。因而，通过预先利用本发明的检测方法确认作为AGEs前体的3,4-DGE的存在，可以将安全性更高的透析液、点滴液等提供给患者。

本发明的方法除了预先使试样与蛋白质或肽反应，并使本发明的抗体与该反应产物反应之外，可以与前述本发明的AGEs检测方法同样地进行。即，当使试样与蛋白质等反应并确认了该反应产物与本发明抗体的抗原抗体反应时，因为是产生了3,4-DGE来源的AGEs，因此可以判断在所述试样中存在3,4-DGE。另外，还可以通过抗原抗体反应的程度对3,4-DGE的含量进行定量。

前述与试样反应的蛋白质没有特别限定，可以举出血清白蛋白、血红蛋白等，例如当给药作为试样的点滴液等时，还优选使用与前述点滴液接触的可能性高的组织的蛋白质。由此，进一步可以充分地预测对生物体给药时的AGEs化。

本发明的免疫试剂的特征在于，是包含抗AGEs的抗AGEs抗体的免疫试剂，所述AGEs为3,4-DGE与蛋白质或肽的反应产

物，所述抗AGEs抗体是所述本发明的抗AGEs抗体。本发明的免疫试剂可以用于前述本发明的AGEs检测方法和3,4-DGE的检测方法中，其使用方法与本发明的抗AGEs抗体相同。

本发明的免疫试剂中，抗AGEs抗体例如可以根据抗原抗体反应的检测方法，用各种标记物质标记。另外，本发明的免疫试剂只要含有本发明的抗AGEs抗体即可，其他组成没有任何限制。

以下，通过实施例和比较例更加具体地说明本发明，但本发明并不限于此。另外，只要没有特别说明，则“%”表示质量%。

### 实施例1

#### 抗3,4-DGE来源的AGEs多克隆抗体的制备

##### (1) AGEs抗原(3,4-DGE来源的AGEs)的制备

首先制备500mM的3,4-DGE水溶液。另一方面，在0.2M磷酸钠缓冲液(PB:pH7.4)中溶解RSA(10mg/ml)和DTPA(5mM)，并且，以3,4-DGE量达到RSA中的NH<sub>2</sub>基的2.5当量的量混合前述3,4-DGE水溶液。该混合液利用0.2 $\mu$ m的过滤器过滤除菌，然后在37 $^{\circ}$ C下孵育3天，进而以3,4-DGE量达到RSA中的NH<sub>2</sub>基的2.5当量的量再次添加前述3,4-DGE水溶液，在37 $^{\circ}$ C下孵育4天。将该反应液加入到脱盐柱(商品名PD-10、Amersham Biosciences公司生产)，利用PBS(-)透析其回收液一昼夜，从而进行脱盐和除去低分子化合物。前述PBS是含有0.15M氯化钠的10mM磷酸缓冲液。该透析后的溶液利用0.2 $\mu$ m的过滤器过滤除菌，作为抗原(3,4-DGE来源的AGEs)溶液。另外，该抗原溶液的浓度是：蛋白质浓度为7mg/ml。

##### (2) 对兔子的免疫

将前述抗原溶液(蛋白质浓度：7mg/ml)与等量的完全弗

氏佐剂混合，使其乳化，将该乳化液隔周给药到兔子背部皮下数个位置。另外，1次的给药量以蛋白质质量计为5mg/只。从免疫开始时刻起按照时间进行采血，通过间接ELISA法确认抗体效价，结果可以判断：通过共计5次的背部皮下免疫，抗体效价充分上升。因此，最后一次（第6次）的给药是将前述抗原溶液原样地给药到兔子耳静脉中，之后的10天后，在麻醉的状态下，从免疫过的兔子身上采集全血（whole blood）。

### （3）抗3,4-DGE来源的AGEs多克隆抗体的提纯

#### （3-1）抗血清的分离

在室温下静置所得的兔子血液约3小时，使血块和血清自然分离后，将它们离心分离（3500rpm、10分钟），将回收的上清液再次离心分离（3500rpm、10分钟）。将如此获得的上清液（抗血清）分为每10ml一份，在56℃下失活处理30分钟，使用之前一直冷冻保存在-80℃下。

#### （3-2）多克隆抗体的提纯

将10ml进行了前述处理的抗血清与等量的0.02M磷酸钠缓冲液（pH7.0）混合后，利用0.45 $\mu$ m的过滤器过滤，在以下所示的条件下进行IgG亲和色谱法，进行多克隆抗体的提纯。

色谱柱：Affi-Gel Protein A Agarose for IgG Purification  
（Bio-Rad公司生产）

柱子规格：10ml（ $\Phi$ 10×100mm）

洗脱液：（A）0.02M磷酸钠缓冲液（pH7.0）

（B）0.1M甘氨酸-盐酸缓冲液（pH2.7）

洗脱条件：由洗脱液（A）向（B）的分级梯度洗脱（Step gradient）

流速：1ml/分钟

首先，将前述抗血清加到用洗脱液（A）平衡好的前述色

谱柱中，通过前述洗脱液（A）进行洗脱。然后，按顺序测定洗脱组分在波长280nm的吸光度，在前述洗脱组分的吸光度基本达到0的时刻，将洗脱液置换为洗脱液（B）。回收由洗脱液（B）获得的洗脱组分（蛋白质组分），在该回收组分中加入1M Tris-HCl缓冲液（pH9.0）进行中和后，离心浓缩直至达到约10ml，将其作为提纯抗3,4-DGE来源AGEs多克隆抗体溶液（蛋白质浓度9.7mg/ml）。另外，前述抗体分为每份1ml，在使用前一直冷冻保存在-80℃下。对于所得的抗3,4-DGE来源的AGEs多克隆抗体，在实施例2~5中确认其性质等。另外，根据本实施例1的方法，数次制备多克隆抗体，结果具有再现性地获得相同的抗体。

## 实施例2

对于通过实施例1获得的抗3,4-DGE来源的AGEs多克隆抗体，确认其结合常数。

结合常数通过竞争ELISA法决定。首先，利用50mM碳酸钠缓冲液将通过实施例1制备的抗原溶液稀释，使其浓度达到1μg/ml。将其加入到96孔免疫板中，每孔加入100μl，在室温下孵育2小时使抗原固定。2小时后除去抗原溶液，利用含有0.05% Tween20的PBS（TPBS）洗涤各孔后，在每孔中加入300μl含有0.5%脱脂乳的PBS，在室温下孵育2小时将未固定的抗原部分封闭。2小时后，除去封闭溶液，利用TPBS洗涤后，向其中加入50μl利用含有0.1%甘油和0.1% Tween20的50ml Tris-HCl缓冲液（pH7.4:TB）稀释过的各种浓度的抗原溶液以及50μl利用含有0.1%脱脂乳的TB稀释了2500倍的实施例1的抗体（一抗）溶液，在室温下孵育2小时。2小时后除去反应液，利用TPBS洗涤后，加入100μl用含有0.3%脱脂乳的TB稀释了2250倍的抗前述一抗的碱性磷酸酶标记羊抗兔IgG抗体溶液（在冷冻干燥品

(CHEMICON公司生产)中加入1ml水和1ml甘油溶解的溶液),在37°C下孵育1小时。1小时后除去反应液,利用TPBS洗涤后,在每孔中加入100 $\mu$ l显色试剂(在9ml水中溶解有2ml商品名Diethanolamine Substrate Buffer (5x) (PIERCE公司生产)和2片商品名ImmunoPure PNP PTablets (PIERCE公司生产)的试剂),在室温下孵育30分钟。孵育后,在每孔中加入50 $\mu$ l 2M氢氧化钠水溶液,使碱性磷酸酶的反应停止,测定405nm的吸光度。之后,通过下式制作图1的曲线,计算离解常数Kd。

$$Kd=k2/k1=[Agf][Abf]/[AgAb]$$

[Agf]: 游离的抗原浓度

[Abf]: 游离的抗体浓度

[AgAb]: 抗原抗体复合物的浓度

由前述图1求出的离解常数Kd为 $5.7 \times 10^{-9}$  (M)。由于结合常数Ka是离解常数Kd的倒数,因此计算出为 $1.8 \times 10^8$  (M<sup>-1</sup>)。由于一般的多克隆抗体的结合常数为 $10^7 \sim 10^9$  (M<sup>-1</sup>),因此可以说通过实施例1获得的抗体与抗原的结合力很充分。

### 实施例3

对于通过实施例1获得的抗3,4-DGE来源的AGEs多克隆抗体,确认其反应特异性。

通过与测定结合常数同样的竞争ELISA法及蛋白质印迹法确认其对3,4-DGE来源的AGEs蛋白质的特异性。以下所示的各种AGEs化蛋白质与前述实施例1的“(1)抗原的制备”同样地制备。另外,Glu-BSA如下制备:将BSA(10mg/ml)和DTPA(5mM)溶解在0.2M PB (pH7.4)中,在其中添加Glu直至达到100mM,在37°C下孵育8周。

#### (1) 竞争ELISA法

作为竞争抑制物质,除了使用被3,4-DGE AGEs化的蛋白质

“3,4-DGE-RSA”、天然蛋白质“RSA、BSA、HSA”、被3,4-DGE以外的羰基化合物（MGO、GO、3-DG）AGEs化的蛋白质“MGO-BSA、GO-BSA、3-DG-BSA”、以及糖基化蛋白质“glycated HSA（SIGMA公司生产：商品名A-8301）”以外，与前述实施例2同样地通过ELISA法评价反应特异性。该结果示于图2（A）（B）中。该图中的（A）为显示3,4-DGE-RSA、天然蛋白质和glycated HSA结果的曲线图、（B）为显示3,4-DGE-RSA和其他AGEs化蛋白质结果的曲线图。另外，该图中的“B”表示在将竞争抑制物质加入到孔中时的405nm的吸光度、“BO”表示在未将竞争抑制物质加入到孔中时的405nm的吸光度，竞争物质的单位（ $\mu\text{g/ml}$ ）表示加入到孔中的竞争抑制物质的浓度。

如图2（A）所示，通过实施例1获得的多克隆抗体与天然蛋白质和glycated HSA不显示交叉反应，另外，如该图（B）所示，与其它的AGEs化蛋白质也不显示交叉反应。

## （2）蛋白质印迹法

使用被3,4-DGE AGEs化的蛋白质“3,4-DGE-RSA、3,4-DGE-BSA、3,4-DGE-HSA”、天然蛋白质“RSA、BSA、HSA”、被3,4-DGE以外的羰基化合物（MGO、GO、3-DG、5-HMF、Fur、AA、FA、glycer、glycol）和Glu AGEs化的蛋白质“MGO-BSA、GO-BSA、3-DG-BSA、5-HMF-BSA、Fur-BSA、AA-BSA、FA-BSA、glycer-BSA、glycol-BSA、Glu-BSA”作为试样。将这些试样（各 $1\mu\text{g}$ ）加入到SDS-PAGE，利用PVDF（聚偏二氟乙烯）膜印迹蛋白质条带。将该膜浸渍在含有0.3%脱脂乳的TTBS（含有0.15M氯化钠和0.1% Tween20的25mM Tris-HCl缓冲液（pH7.4））中，在室温下孵育1小时进行封闭。孵育后，除去封闭溶液，利用TTBS洗涤，然后浸渍在用封闭溶液稀释了12000倍的实施例1的抗体（一抗）溶液中，在室温下

孵育1小时。孵育后除去一抗溶液，利用TTBS洗涤后，浸渍在用封闭溶液稀释了12000倍的抗前述一抗的碱性磷酸酶标记羊抗兔IgG抗体溶液（CHEMICON公司生产）中，在室温下孵育1小时。孵育后除去反应液，利用TTBS洗涤后，通过按照使用说明书制备的显色试剂（BCIP/NBT（氮蓝四唑/5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐）；Promega公司生产）使其显色。其结果示于图3的照片中。另外，前述5-HMF表示5-羟甲基-糠醛、前述Fur表示糠醛、前述AA表示乙醛、前述FA表示甲醛、前述glycer表示甘油醛、前述glycol表示乙醇醛。

如图3所示，仅在被3,4-DGE AGEs化的3,4-DGE-BSA（条带1）、3,4-DGE-RSA（条带3）、3,4-DGE-HSA（条带5）确认有显色，天然蛋白质、被其他羰基化合物AGEs化的蛋白质未显示交叉反应。

由以上的竞争ELISA法和蛋白质印迹法的结果可知，实施例1的多克隆抗体仅特异性识别被3,4-DGE AGEs化的蛋白质。

#### 实施例4

利用3,4-DGE进行细胞内蛋白质的AGEs化，利用实施例1的多克隆抗体进行AGEs的检测。

将悬浮在含有20%FBS（胎牛血清）的M199培养基（以下称为“FBS-M199培养基”）的人腹膜间皮细胞（HPMC）接种于8孔玻片室中，培养至铺满（37℃）。培养后从前述玻片室中除去培养基，将利用M199培养基稀释至30μM、250μM的3,4-DGE溶液暴露于HPMC。另外，对照组是暴露M199培养基。培养2小时后，除去前述M199培养基，之后用PBS洗涤HPMC，进而注入-30℃的冷甲醇，在-30℃下固定5分钟。接着，利用PBS洗涤后，滴加含有0.2%TritonX-100的PBS，在室温下进行浸渍化处理5分钟。除去浸渍化溶液并用PBS洗涤后，滴加含有5%正

常猪血清（DAKO公司生产）的PBS，在室温下放置5分钟，进行封闭。除去封闭溶液，滴加用含有5%正常猪血清的PBS稀释了500倍的实施例1的抗体（一抗）溶液，在室温下孵育1小时。孵育后除去一抗溶液，利用PBS洗涤后，滴加用含有5%正常猪血清的PBS稀释了30倍的抗前述一抗的FITC标记的猪抗兔IgG抗体溶液（DAKO公司生产），在暗处室温下孵育1小时。孵育后除去反应液，利用PBS洗涤后，利用荧光显微镜观察。结果示于图4的显微镜照片中。该图的（a）为未暴露于3,4-DGE的对照组的結果、（b）为3,4-DGE浓度为30 $\mu$ M的结果、（c）为3,4-DGE浓度为250 $\mu$ M的结果，左列为明亮视野的照片、右列为荧光显微镜照片。

如该图（b）和（c）所示，只有暴露在3,4-DGE中的HPMC观察到荧光、该图（a）的对照组中未检查到荧光。由此可知，实施例1的多克隆抗体在人体细胞中仅特异性地结合于被暴露的被3,4-DGE AGEs化的蛋白质，另外，实施例1的多克隆抗体可以用于人体细胞的抗体染色中。

#### 实施例5

对腹膜透析的模型大鼠，确认腹膜的3,4-DGE来源的AGEs的累积。

在2组大鼠腹腔中分别给药3,4-DGE浓度为2 $\mu$ M、58 $\mu$ M的透析液30天（2次/天：各组7只）。另外，对照组（7只）不给药透析液，仅扎针。由各大鼠身上采集壁侧腹膜，冷冻包埋，制作薄切片。利用多聚甲醛固定该切片，滴加用含有0.5%脱脂乳的PBS稀释了500倍的实施例1的抗体（一抗）溶液，在室温下孵育1小时。孵育后除去一抗溶液，利用TTBS洗涤后，按照使用说明用抗前述一抗的碱性磷酸酶标记二抗试剂盒（商品名DAKO LSAB 2System Alkaline Phosphatase; DAKO公司生产）

处理。除去反应液利用TTBS洗涤后，通过按照使用说明书制备的显色试剂（商品名New Fuchsin；DAKO公司生产）使其显色。其结果示于图5的照片中。该图的（A）为对照组、（B）为利用含有 $2\mu\text{M}$ 的3,4-DGE的透析液进行透析的大鼠结果的照片、（C）为利用含有 $58\mu\text{M}$ 的3,4-DGE的透析液进行透析的大鼠结果的照片。

如图5所示，与对照组（该图（A））相比，在利用前述含有3,4-DGE的透析液进行透析的大鼠（该图（B）、（C））中确认了显色，特别是在3,4-DGE含量多的大鼠中可见强的显色（该图（C））。由此可以推测，通过透析液中所含的3,4-DGE，腹膜组织被AGEs化。根据该实验可以说，通过实施例1的多克隆抗体还可以进行生物组织的抗体染色。

#### 实施例6

通过与前述实施例1相同的方法制备抗3,4-DGE来源的AGEs多克隆抗体，利用反应特异性和结合常数，与前述实施例1的抗体进行比较。

反应特异性与前述实施例3同样地通过竞争ELISA法确认。该结果示于图6（A）、（B）中。该图（A）为表示3,4-DGE-RSA、天然蛋白质和glycated HSA结果的曲线图，（B）为3,4-DGE-RSA以及其他AGEs化蛋白质结果的曲线图。另外，该图的“B”和“BO”与前述相同。

将该结果与通过前述实施例1制备的抗体结果（图2（A）、（B））相比较，实施例6的多克隆抗体未显示与天然蛋白质和glycated HSA的交叉反应，另外，如该图（B）所示，与其他的AGEs化蛋白质也未显示交叉反应，显示出与实施例1的抗体相同的行为。

结合常数与前述实施例2同样地通过竞争ELISA法决定，同

样，由图7所示的曲线计算结合常数。该结果证明：由前述图7求出的结合常数为 $1.9 \times 10^8$  ( $M^{-1}$ )，与前述实施例2的实施例1多克隆抗体的结合常数数量级相同。由以上结果可知，根据前述实施例1的方法，可以再现性良好地获得同样的抗体。

#### 实施例7

制备反应时间不同的AGEs抗原（3,4-DGE来源的AGEs），确认是否能够不依赖于反应时间地利用前述实施例1的抗3,4-DGE来源AGEs多克隆抗体进行检测。

在PBS（pH7.4）中溶解BSA（5mg/ml），进而以3,4-DGE量达到BSA中 $NH_2$ 基的4当量的量混合前述3,4-DGE水溶液，在 $37^\circ C$ 下孵育规定时间（2、4、8、24、72、168小时），除此之外与前述实施例1同样地制备抗原（3,4-DGE来源AGEs）。然后通过前述实施例3同样的竞争ELISA法评价所得的各抗原与实施例1的多克隆抗体的反应性。结果示于图8的曲线图中。另外，该图的“B”和“BO”与上述相同。

如图8所示可知，对各抗原的结果全部同样显示向右下倾斜的行为，其反应性依赖于竞争浓度。由此结果可以说，与蛋白质和3,4-DGE的反应时间无关，生成同样的AGEs。另外，由于B/BO值依赖于反应时间而减少，因此根据反应时间AGEs化的程度不同，蛋白质的完全AGEs化需要例如72小时左右的孵育。

（参考例1）

进行利用3,4-DGE的蛋白质的AGEs化，确认所得AGEs的反应性、物性。

#### 1.与蛋白质的反应性

（外观）

使用羰基化合物（3,4-DGE、MGO、GO、3-DG、Glu），进行蛋白质BSA的AGEs化。首先，以BSA（SIGMA公司生产：

商品名A-0281)达到浓度5mg/ml(碱性氨基酸残基6.2mM)的量,溶解在PBS(pH7.4)中,制备BSA溶液。在前述BSA溶液中添加羰基化合物,使羰基化合物浓度达到25mM(BSA中的碱性氨基酸残基的4当量),在37℃下孵育规定时间(2、4、8、24、72、168小时)。另外,各种羰基化合物使用500mM的3,4-DGE水溶液(本公司制备)、40% MGO水溶液(SIGMA公司生产)、40% GO水溶液(和光纯药工业公司生产)、3-DG(同仁化学公司生产)、Glu(药典、San-ei Sucrochemical Co, Ltd.生产)。另外,将未添加羰基化合物的BSA溶液同样地孵育,作为对照组。将孵育168小时后的反应液外观示于图9的照片中。该图中,从左开始为3,4-DGE(DGE)、MGO、GO、3-DG(3DG)、Glu、空白(对照组)的结果。

使用3,4-DGE时,反应液在约2小时着色,之后褐色随着时间而加深,在168小时后确认为图示的浓重褐色。如图所示,在与Glu的反应液中未见褐色化,对于已知作为AGEs化的介质的MGO、GO、3-DG,发现褐色化,因此可以说3,4-DGE与MGO、GO、3-DG同样地发生了梅拉德反应后期的AGEs化。而且,由于褐色很浓重,因此可知3,4-DGE对于蛋白质的反应性很强。

(荧光强度)

采集如上孵育的反应液,将这些样品反应液加入到脱盐柱(商品名PD-10、amersham pharmacia biotech公司生产)进行脱盐。对于脱盐后的反应液,使用BCA蛋白分析试剂盒(Pierce公司生产)测定BSA浓度,用水稀释使得BSA浓度达到1.0mg/ml,将其作为试样溶液。另外,这些试样溶液在使用之前一直冷冻保存在-30℃。将这些试样溶液注入到96孔白色板中,在激发波长360nm、荧光波长430nm下测定荧光强度(测定装置:商品名SPECTRAFLUOR PLUS、TECAN公司生产)。这

些结果示于图10中。另外，图中的“BSA”表示未添加羰基化合物的对照组。

如图所示，使用了3,4-DGE的试样与其他的羰基化合物相比，荧光强度极强，通过24小时的反应基本达到平衡。

## 2.反应物的评价

对于羰基化合物（3,4-DGE、3-DG、GO、MGO）的前述试样溶液，利用ELISA法确认是否生成作为已知AGEs的戊糖素、羧甲赖氨酸（CML）、梅拉德反应产物（MRX：8-羟基-5-甲基二氢噻唑[3,2- $\alpha$ ]）。结果，使用了GO的反应液在孵育24小时的阶段每个BSA分子已经产生了3.025分子的CML，而在168小时后，每个BSA分子产生了3.7分子的CML。另外，使用了MGO的反应液经过168小时后，确认每个BSA分子产生了0.0028分子的戊糖素。与此相对，使用了3,4-DGE的反应液没有生成CML、戊糖素、MRX所有物质。由此可知，由3,4-DGE所生成的AGEs与以往公知的AGEs不同。

## 3.氨基酸分析

将前述试样溶液冷冻干燥后，在6N盐酸中酸水解（120℃、24小时）。根据现有公知的方法，用丹磺酰氯将其衍生化，利用HPLC分离，研究试样中的精氨酸（Arg）和赖氨酸（Lys）的残基量（ $n=3$ ）。该结果示于图11（A）（B）中。该图（A）为显示Arg残基的残存率的曲线图，（B）为显示Lys残基的残存率的曲线图。另外，该残存率表示的是将未处理的天然BSA中的残基量作为100%时的残存率。

如图11（A）所示，与其他羰基化合物引起的AGEs化同样地，游离Arg和Lys减少。由此可推测与现有公知的AGEs同样地，3,4-DGE与Arg残基、Lys残基反应。

## 4.等电点电泳

预先将等电点标记施加在电泳中，制作pI与迁移率的标准曲线。然后对于前述试样溶液也进行电泳，将各试样中染色最浓的部分作为条带的中心，使用前述标准曲线求出等电点。另外，将各试样的等电点的变化示于图12中。

如图12所示，使用了3,4-DGE的试样被确认在反应24小时后向酸性侧位移。由此可知，在反应了24小时的时刻，蛋白质的AGEs化已经开始。

### 5.SDS-PAGE

对于使用了3,4-DGE和MGO的试样，分别进行SDS-PAGE。将这些结果示于图13的电泳照片中。另外，该图（A）显示3,4-DGE的结果、该图（B）显示MGO的结果，条带从左侧开始依次为分子量标记、天然BSA、试样（2、4、8、24、72、168小时）的结果。

如图所示，反应2~4小时时条带混乱，因此认为蛋白质结构变化很大、发生了AGEs化。另外，公知的引起AGEs化的羰基化合物MGO，也可见相似的条带变化。

（参考例2）

对于以3,4-DGE为首的羰基化合物，确认了与蛋白质的反应性。作为羰基化合物，使用3,4-DGE、MGO、GO、3-DG、AA、FA、Fur、5-HMF、Glu。

将BSA溶解在PBS（pH7.4）中并使BSA浓度达到10mg/mL。向其中添加各种羰基化合物使羰基化合物浓度达到30mmol/L，在37℃下反应24小时。反应后，利用反应液的荧光强度（激发波长360nm、荧光波长430nm）评价BSA的改性（AGEs化）。其结果示于图14中。

如图14所示，添加了3,4-DGE的BSA溶液与其他羰基化合物相比显示极强的荧光。由该结果可知，3,4-DGE富于与蛋白

质的反应性，是很强的AGEs的中介体。

(参考例3)

确认了3,4-DGE来源的AGEs化蛋白质的细胞毒性。

为了研究来源于各种羰基化合物的AGEs化蛋白质的生物活性，实施细胞毒性试验。另外，作为AGEs化蛋白质，使用与实施例3同样制备的3,4-DGE-BSA、MGO-BSA、GO-BSA、AA-BSA。

将悬浮在FBS-M199培养基中的人腹膜间皮细胞(HPMC)接种在96孔板(Iwaki公司生产)，每孔3400个细胞，培养1晚。将孔中的贴壁细胞暴露于溶解有1mg/mL AGEs化蛋白质的含8.4%FBS的M199培养基(0.1mL/孔)中，培养4天。暴露后除去前述培养基，利用含有10%显色基质(商品名WST-1; TAKARA BIO, INC.生产)的M199培养基培养，测定40分钟后的波长405nm的吸光度，求出活细胞数。该结果示于图15的曲线图中。另外，图中的DGE-BSA表示3,4-DGE-BSA。

如图所示，其他蛋白质不影响细胞活性，相反，暴露在3,4-DGE AGEs化的BSA溶液中的细胞的活性降低至约25%。由此结果可确认，由3,4-DGE生成的AGEs化蛋白质显示极强的细胞毒性。

#### 实施例8

使用通过前述实施例1制备的抗体检测由腹膜透析液中所含的3,4-DGE形成AGEs。

作为腹膜透析液，分别使用不含3,4-DGE的透析液A、3,4-DGE浓度为15 $\mu$ M的透析液B、3,4-DGE浓度为6 $\mu$ M的透析液C。首先，按照体积比9:1(v/v)混合各透析液和200mM磷酸钠缓冲液(pH7.4)，将pH调整到7.15~7.27后，溶解HSA(人血清白蛋白)使之达到2mg/ml。在37 $^{\circ}$ C下孵育该溶液4周后作为

分析试样。将3 $\mu$ g的这些各试样加入到SDS-PAGE,使用通过前述实施例1制作的抗体,与前述实施例3同样地进行蛋白质印迹。作为阴性对照组,对HSA同样地进行SDS-PAGE和蛋白质印迹;作为阳性对照,对3,4-DGE-HSA同样地进行SDS-PAGE和蛋白质印迹。另外,阳性对照的3,4-DGE-HSA与前述实施例3同样地制备。该结果示于图16中。如该图所示,在孵育含有3,4-DGE的透析液A、B、C和HSA获得的分析试样中,在116kDa、200kDa附近确认了显示与抗体的反应的条带。这些116kDa、200kDa附近的条带由于HSA的分子量为66kDa,因此认为是通过与3,4-DGE反应而交联的HSA的二聚物和三聚物。这样,如果使用含有3,4-DGE的透析液,则其与蛋白质反应,形成3,4-DGE来源的AGEs。另外,通过前述实施例1制作的抗体可以检测这些AGEs,因此通过比较条带浓度,还可以定量所生成的AGEs。

#### 实施例9

将肾功能不全患者的血清蛋白质作为分析试样,使用通过前述实施例1制作的抗体确认有无3,4-DGE来源的AGEs。

将9位肾功能不全患者的血清蛋白质(富含白蛋白的总蛋白质)作为试样,将8 $\mu$ g各试样分别加入到SDS-PAGE,使用通过前述实施例1制作的抗体,与实施例3同样地进行蛋白质印迹。另外,同时将健康者的血清蛋白质也作为试样。阳性对照组使用与前述实施例8相同的3,4-DGE-HSA。其结果示于图17中。另外,该图显示了9位患者中的2位(患者A和患者B)的结果。如该图所示,在患者A和患者B的试样中,在116kDa附近确认了显示与抗体反应的条带。另外,剩余的7位患者也得到了与该图相同的结果。与此相对,对于健康者基本看不到条带。由该结果可以确认,在肾功能不全患者的血清中存在3,4-DGE来源的AGEs。

### 产业实用性

如上所述，通过本发明的抗AGEs抗体，例如可以检测3,4-DGE来源的AGEs。因此可以说，本发明对前述3,4-DGE来源的AGEs的进一步研究、以及被认为与前述3,4-DGE来源的AGEs相关的各种疾患诊断等有用。

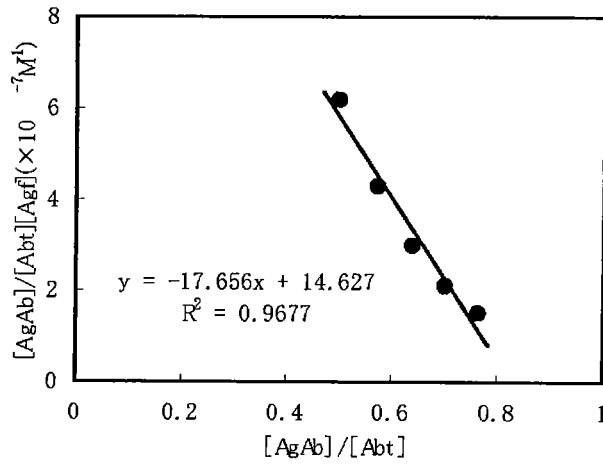


图 1

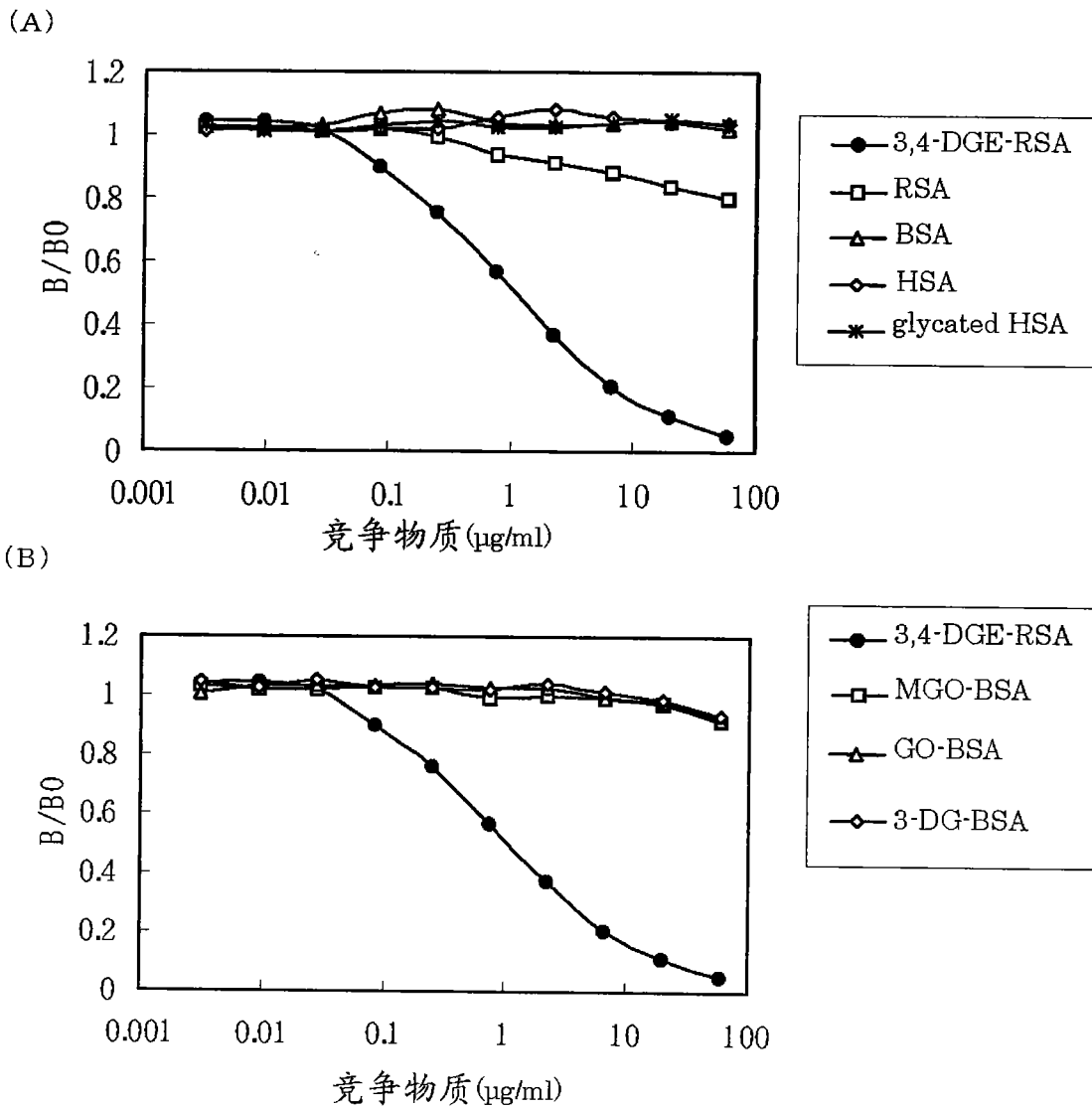
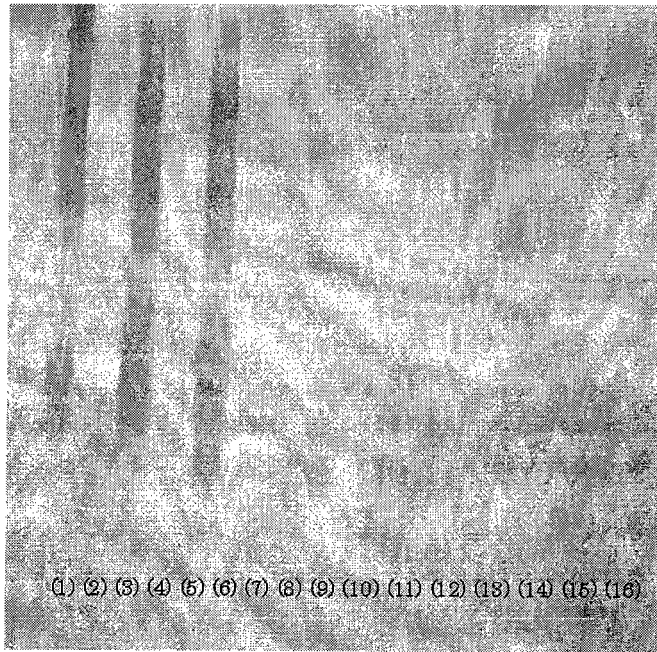


图 2



- (1)3,4-DGE·BSA
- (2)BSA
- (3)3,4-DGE·RSA
- (4)RSA
- (5)3,4-DGE·HAS
- (6)HAS
- (7)MGO·BSA
- (8)GO·BSA
- (9)3-DG·BSA
- (10)5-HMF·BSA
- (11)Fur·BSA
- (12)AA·BSA
- (13)FA·BSA
- (14)glycer·BSA
- (15)glycol·BSA
- (16)Glu·BSA

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16)

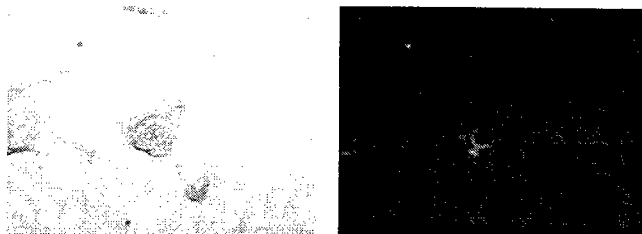
Lane No.

图 3

(a) 未暴露于3,4-DGE (对照)



(b) 暴露于30 μM的3,4-DGE



(c) 暴露于250 μM的3,4-DGE

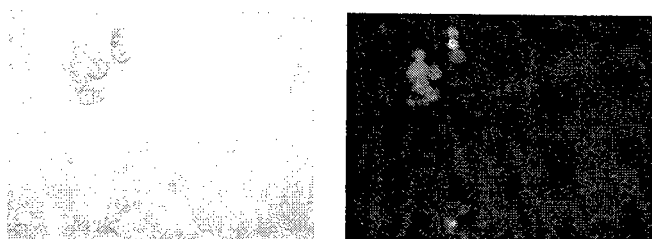


图 4

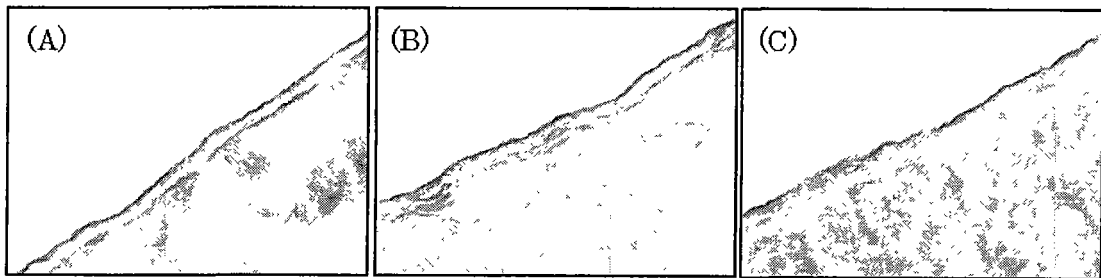


图 5

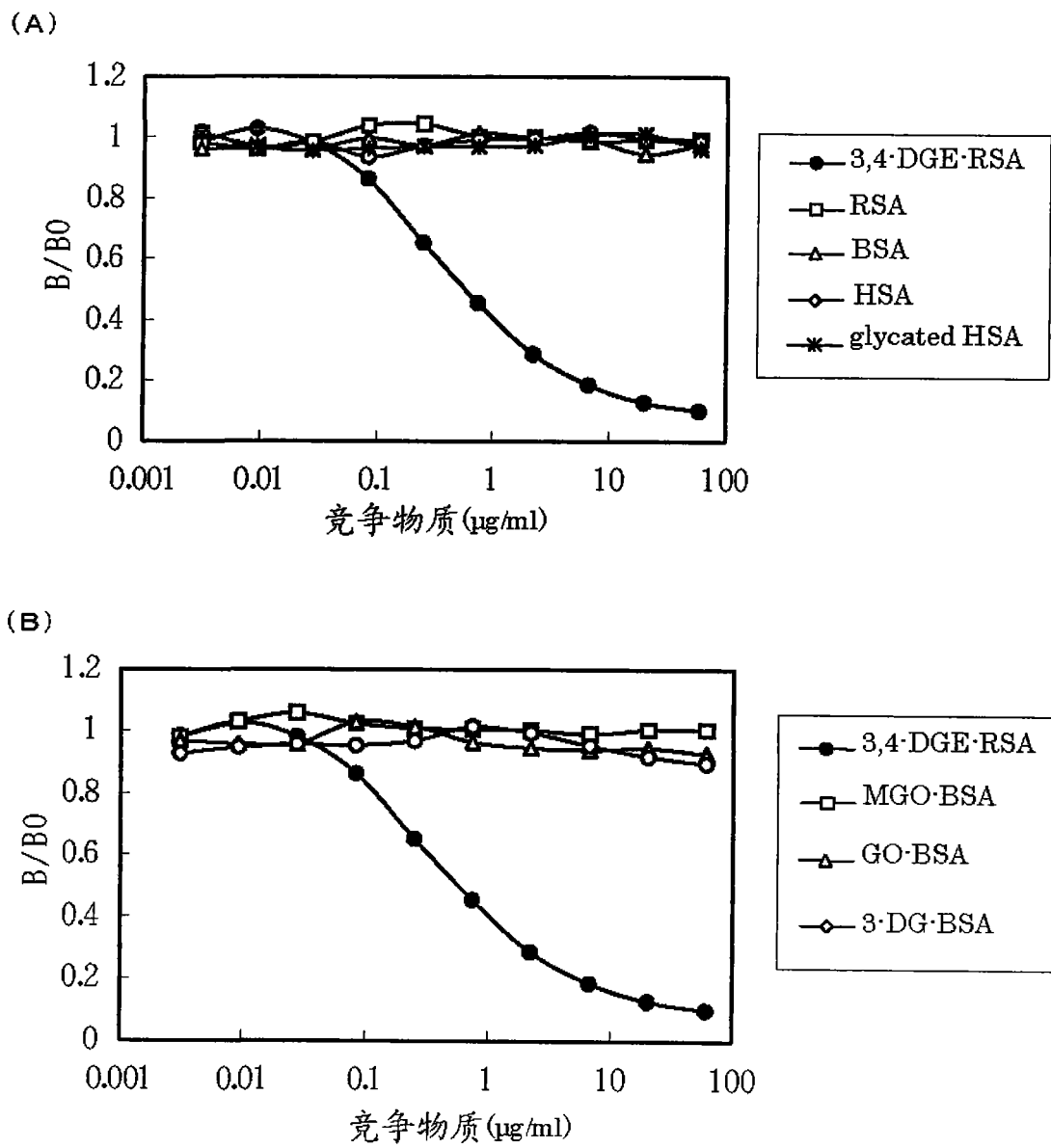


图 6

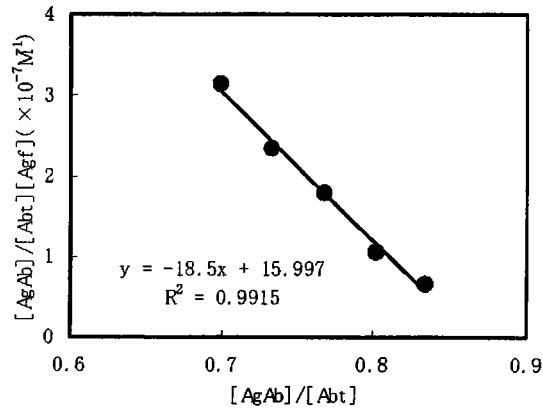


图 7

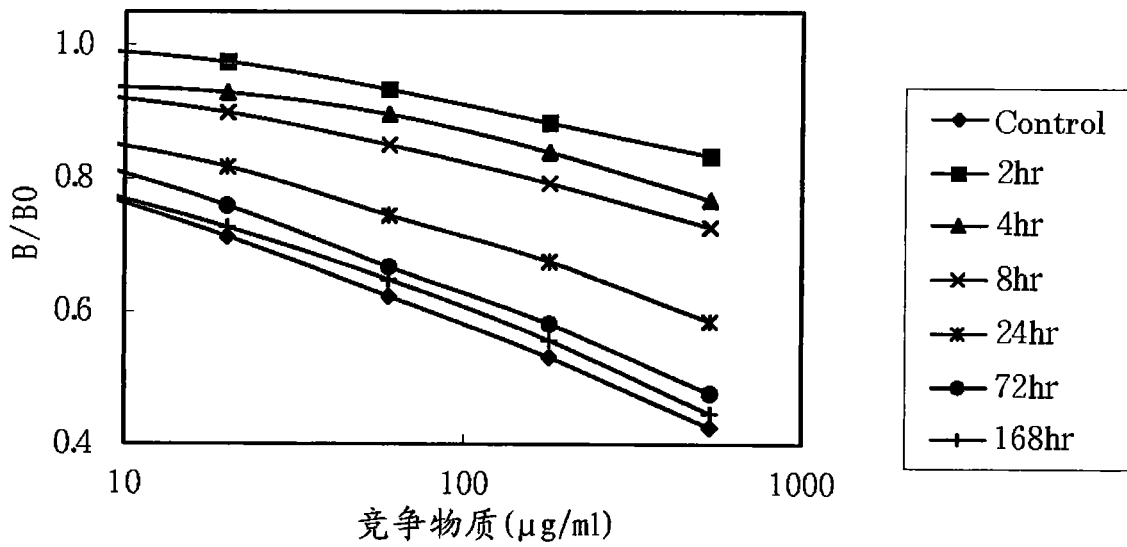


图 8

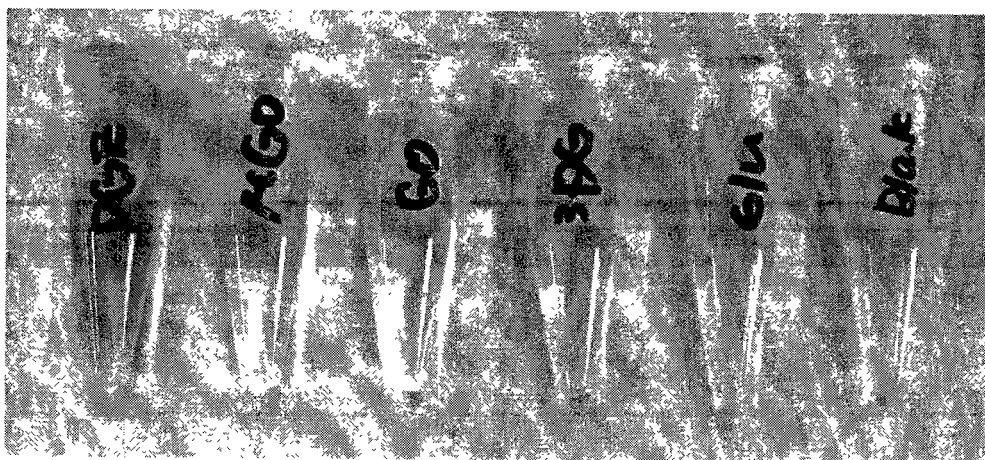


图 9

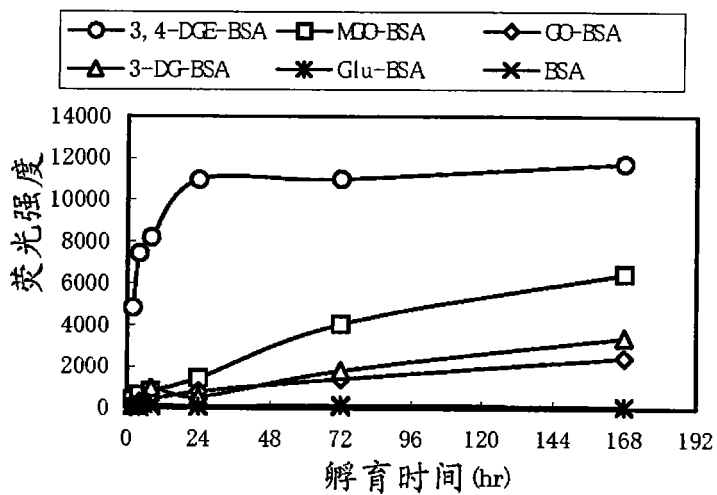


图 10

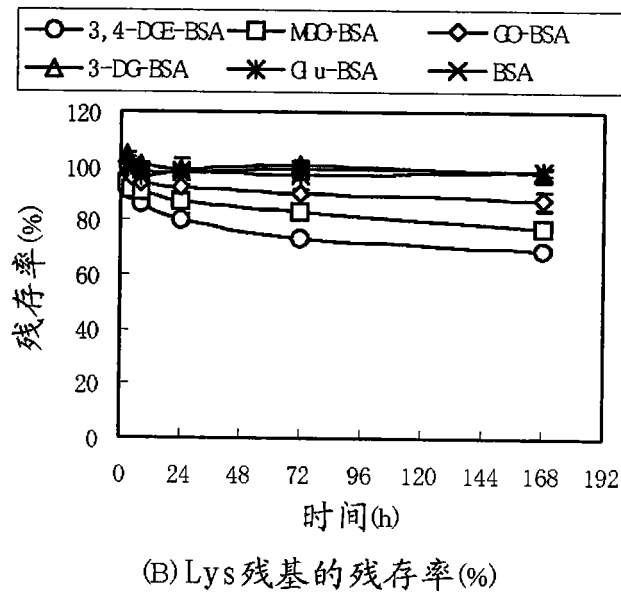
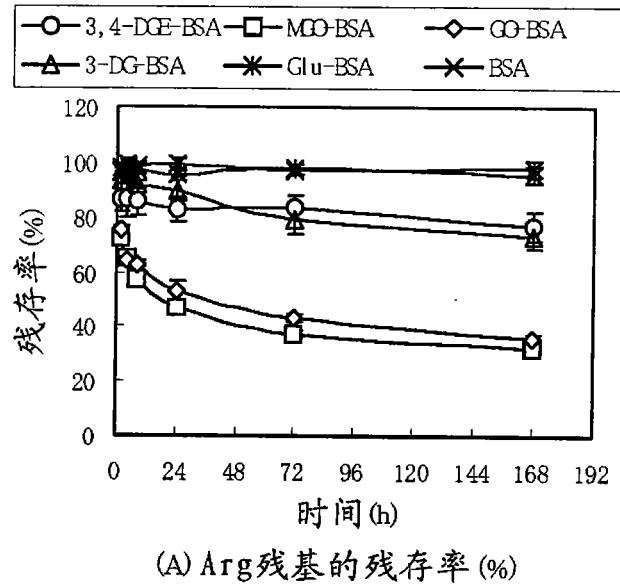


图 11

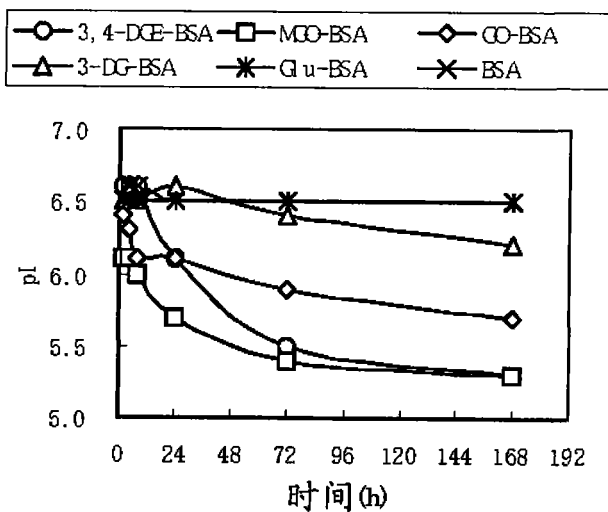


图 12

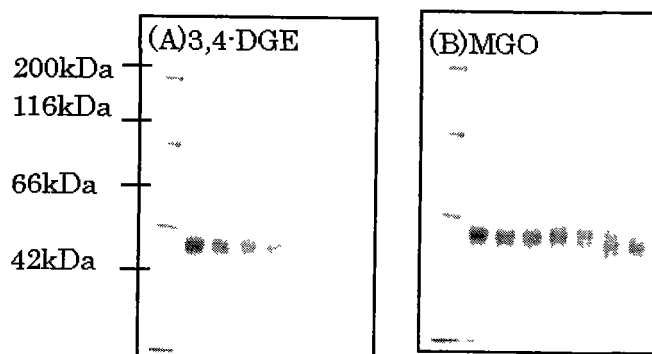


图 13

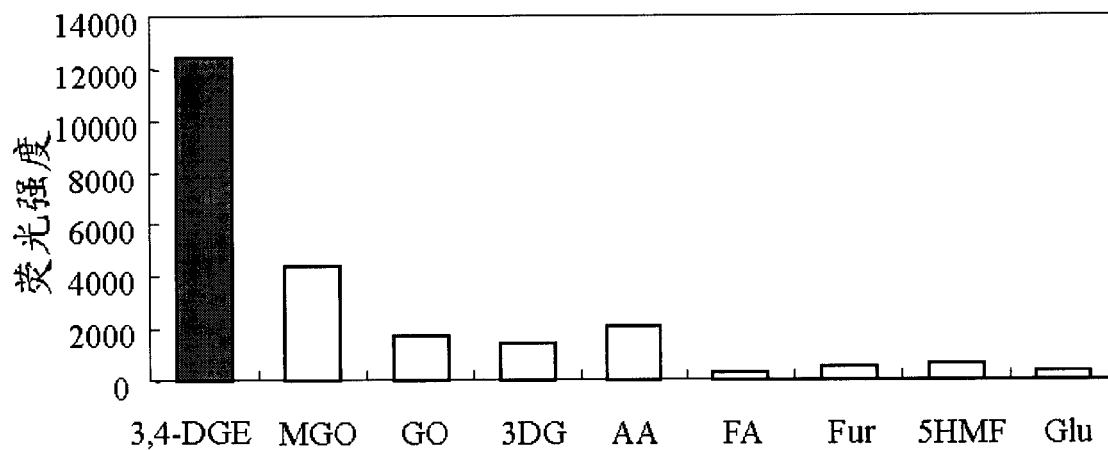


图 14

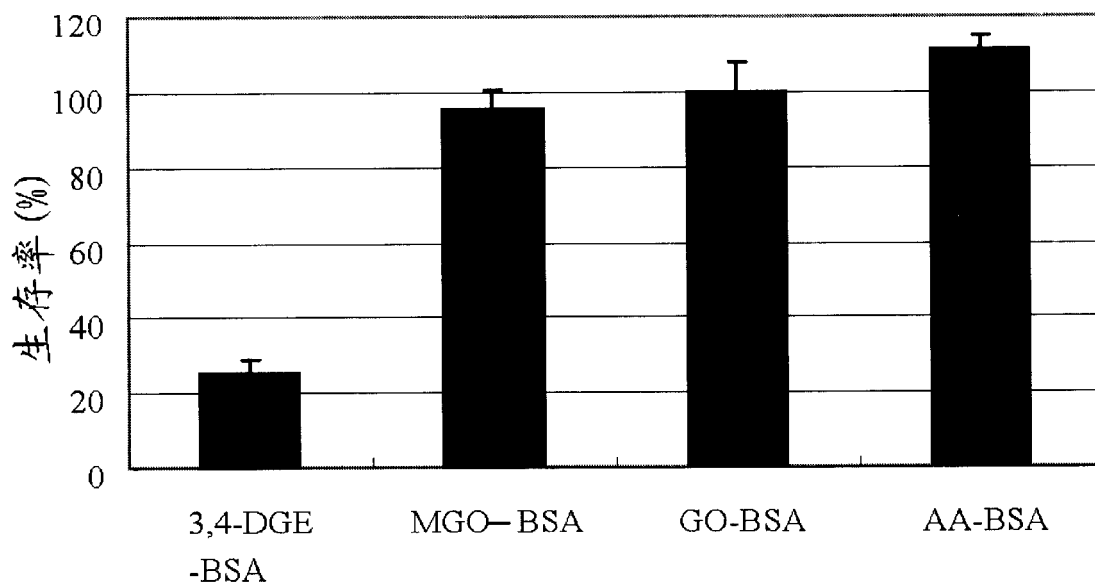


图 15

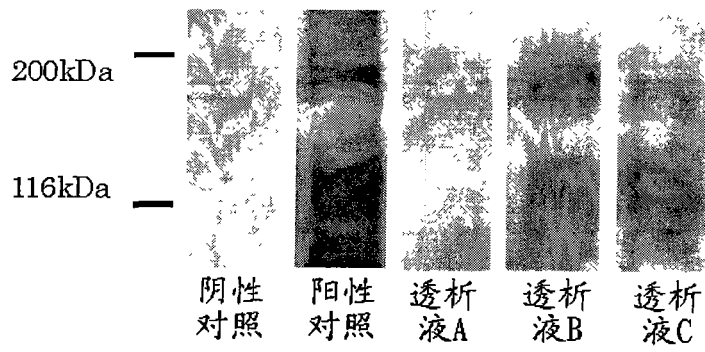


图 16

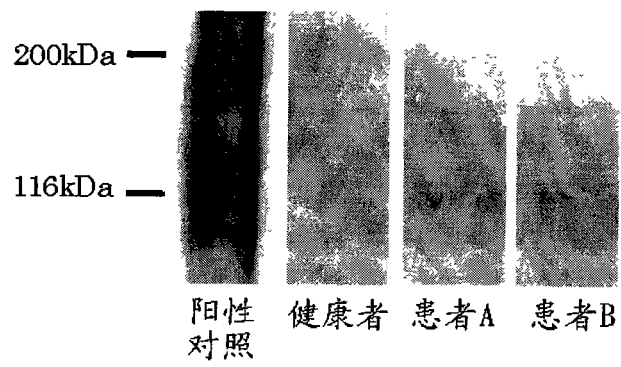


图 17

专利名称(译)	对3,4 - DGE来源的AGEs特异性反应的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101120019A</a>	公开(公告)日	2008-02-06
申请号	CN200680005081.8	申请日	2006-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社ETC.		
申请(专利权)人(译)	株式会社ETC.		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社ETC.		
[标]发明人	山本敬史 木村祐子		
发明人	山本敬史 木村祐子		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/44 C07K1/22 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N2800/042 G01N33/564 G01N2400/02 C07K16/18 G01N2800/347		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2005108623 2005-04-05 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供与蛋白质或肽的反应性强的羰基化合物来源的AGEs抗体，以及提供所述羰基化合物来源的AGEs的检测方法。使3,4 - 二脱氧葡萄糖酮 - 3 - 烯(3,4 - DGE)与蛋白质反应，将其反应产物AGEs免疫致敏在宿主动物中，从所述宿主动物身上回收血清，从该血清分离出抗所述反应产物AGEs的抗体(抗AGEs抗体)。将该分离出的抗AGEs抗体与试样反应，检测所述试样中的AGEs与抗AGEs抗体的抗原抗体反应，从而可以检测所述试样中的AGEs的有无或含量。

