

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/107170

発行日 平成23年6月30日(2011.6.30)

(43) 国際公開日 平成21年9月3日(2009.9.3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2010-500454 (P2010-500454)	(71) 出願人	899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/002376	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(22) 国際出願日	平成20年8月29日(2008.8.29)	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(31) 優先権主張番号	特願2008-51165 (P2008-51165)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(32) 優先日	平成20年2月29日(2008.2.29)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗CRP抗体及びその利用

(57) 【要約】

被検試料中のCRPを特異的に認識し、高い感度で測定できる手段の提供。

C-反応性タンパク質（以下、CRPという）に反応し、配列番号1に示すCRPのアミノ酸配列の147～172領域に存在するエピトープを認識する抗CRP抗体。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C-反応性タンパク質（以下、CRPという）に反応し、配列番号1に示すCRPのアミノ酸配列の147～172領域に存在するエピトープを認識する抗CRP抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体である請求項1記載の抗CRP抗体。

【請求項 3】

受領番号FERM ABP-11001として寄託されたハイブリドーマより産生されるものである請求項2記載の抗CRP抗体。

【請求項 4】

配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドを免疫原として得られたものである請求項1～3のいずれか1項記載の抗CRP抗体。

【請求項 5】

ペプチドが組換えペプチドである請求項4記載の抗CRP抗体。

【請求項 6】

ハイブリドーマCRP8（受領番号FERM ABP-11001）。

【請求項 7】

請求項1～5のいずれか1項記載の抗CRP抗体を含有するCRP測定試薬。

【請求項 8】

被検試料に請求項1～5のいずれか1項記載の抗CRP抗体を接触させて免疫測定を行うことを特徴とするCRPの測定方法。

【請求項 9】

被検試料が、血液、血清又は血漿である請求項8記載の測定方法。

【請求項 10】

免疫測定の手段がELISA又はラッセクス凝集法である請求項8又は9記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗CRP抗体及びその利用に関し、より詳細にはEpitope解析法を利用して抗CRP抗体が認識するCRP上の反応部位を特定し、当該反応部位を利用して作製した抗体を用いて免疫アッセイを行うことによりCRPを特異的且つ高感度に測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

C-反応性タンパク質（CRP）は、肺炎双球菌のC多糖体と沈降反応を示す血清タンパク質で、通常正常ヒト血清中に微量（平均580ng/ml）に存在する。CRPは、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じると急速に血中に増加し、病状の回復に伴い速やかに減少する特徴をもつ。従って、血中CRP濃度の測定は、関節リウマチ、細菌性感染症、ウイルス性肝炎、肺炎、尿路感染症などの炎症、組織破壊性疾患の診断に広く臨床的に利用されている（非特許文献1参照）。

従来のCRP測定は、急性炎症時における通常時からの大幅な濃度上昇を測定していたため、感度に優れた測定法はあまり必要とされていなかった。しかし、近年、虚血性心疾患（心筋梗塞）や新生児感染症等の予知マーカーとしての有用性が確認され、その測定には精密性と高感度性が要求されている。また、CRPと菌周病等の様々な疾患との関連性も指摘され、微量（低濃度）のCRP測定値の臨床的意義は極めて高い（非特許文献2参照）。

【0003】

一方、CRP測定に使用される抗CRP抗体は、主に天然タンパク質を抗原として作製されている。そのため、非特異的反応が起こり易く、また精製タンパク質をヒト血清から

10

20

30

40

50

得る場合は、倫理的な問題や製造物にロット差があるなど多くの問題がある。

そこで、遺伝子組換えヒトCRP (rCRP) を用いて抗体を作製する方法も提案されているが、結合特異性において十分とはいえない。

【非特許文献1】福岡良男ら、臨床免疫学、医歯薬出版、1997年

【非特許文献2】高橋伯夫、「高感度CRP測定法の病態診断的有用性」、臨床病理、2002年、第50巻、p30-39

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、被検試料中のCRPを特異的に認識し、高い感度で測定できる手段を提供することを目的とする。 10

【課題を解決するための手段】

【0005】

抗CRP抗体がCRP上のどの領域を認識して結合するかは従来知られておらず、CRPの特定部位を認識することが明らかな抗CRP抗体は得られていない。そこで、本発明者は、Epitope解析法を利用して抗CRP抗体が認識するCRP上の反応部位の解析を行ったところ、CRPのアミノ酸配列の147~172領域に抗原特異性を有する抗体を見出した。そして、当該領域を認識する抗体を用いてイムノアッセイを行えば、極めて特異的に且つ高感度で被検試料中のCRPを測定できることを見出し、本発明を完成した。 20

【0006】

すなわち、本発明は、CRPに反応し、配列番号1に示すCRPのアミノ酸配列の147~172領域に存在するエピトープを認識する抗CRP抗体を提供するものである。

また、本発明は、上記抗体を産生するハイブリドーマCRP8を提供するものである。

また、本発明は、上記抗体を含有するCRP測定試薬を提供するものである。

さらに、本発明は、被検試料に上記抗体を接触させて免疫測定を行うことを特徴とするCRPの測定方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、特異的反応によって被検試料中のCRPを極めて高感度に検出できるため、これを用いれば、局所的炎症や小部位の病変等、体内の極小さい炎症も捉えることができ、臨床検査において様々な疾患の発見や重症度、予後、あるいは治療効果の判定などに極めて有用である。また、抗体作製に遺伝子組換え体を利用することで、CRP測定試薬のコストダウンが期待できる。 30

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】PCRで増幅したCRP遺伝子を示す図である。

【図2】抗CRPモノクローナル抗体感作Latex試薬の反応性の結果を示す図である。

。

【図3】肝疾患検体中のCRP濃度を測定した結果を示す図である。 40

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

ヒトCRPは、5つのサブユニットからなる分子量105,000Daのタンパク質である。そのアミノ酸配列は公知であり、例えばJ. Biol. Chem., 260, 13377-13383, 1985に記載されている。

【0010】

本発明の抗CRP抗体は、ヒトCRPに対して反応性を有し、配列番号1に示すCRPのアミノ酸配列の147~172領域に存在するエピトープを認識する。抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれをも含むが、特に好ましいものとして、受領番号FERM ABP-11001として寄託されたハイブリドーマCRP8よ 50

り産生され、配列番号1に示すCRPのアミノ酸配列の147～172領域に存在するエピトープを認識するモノクローナル抗体を挙げることができる。

【0011】

このような特定の領域をエピトープとして認識する抗CRP抗体は、公知の方法により得ることができ、例えば前記領域のアミノ酸配列を含むペプチドを免疫抗原として抗体を作製することにより得ることができる。また、常法により抗体を作製した後、得られた抗体が認識するエピトープを決定し、目的のエピトープを認識する抗体を選択することにより得ることもできる。ここで、抗体のエピトープは、ELISA、ウエスタンブロットなどにより決定することができる。

【0012】

10

本発明において、免疫抗原としては、天然型ヒトCRPや遺伝子組換え型CRP（rCRP）、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドなどを使用することができる。特に、力価及び特異性の高い抗体を得る点から、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドを用いるのが好ましい。上述したように、天然型ヒトCRPを用いる抗体の生産は良く知られた方法であるが、免疫アッセイにおいて非特異的な反応が多く、また精製タンパク質をヒト血清から得る場合は、倫理的な問題や製造物のロット差の問題など多くの問題がある。これに対し、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドを利用する方法は、原料に由来する問題がなく、またタンパク発現やペプチド合成設備を有する施設で容易に入手可能であり、測定精度や正確度においても特異性が高く、極めて有用である。

20

【0013】

配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいはCRPを適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成は、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

なかでも、遺伝子工学的手法が好ましく、組換えペプチドは、公知の方法、例えばCRPのアミノ酸配列の147～172領域を含むペプチド（これと実質的に同じ活性を有するペプチドも含む）をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターにクローニングし、次いで得られた組換えプラスミドを大腸菌などの適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、その培養物から所望のペプチドを分離及び精製することによって調製することができる。目的のタンパク質が得られたか否かは、SDS-ポリ

30

【0014】

ここで、CRPのアミノ酸配列の147～172領域をコードするポリヌクレオチドは、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えばCRPのアミノ酸配列の情報を基にして作成した適当なプライマーを用いてPCRにより目的の遺伝子を増幅する方法などにより調製することができる。

【0015】

ペプチドを免疫抗原として用いる場合には、アルブミン、グロブリンなどの哺乳動物由来タンパク質；キーホールリンベットヘモシアニンなどのタンパク質；不活性化した結核菌などの微生物；ポリリジン、ポリアスパラギンなどのポリアミノ酸などの担体と結合させて免疫することが望ましい。

40

【0016】

本発明のモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体の公知な方法に従って、抗原を免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髄腫細胞とを融合して得られるハイブリドーマにより産生される。

【0017】

すなわち、先ず感作抗原を哺乳動物の腹腔内、皮下、血管内、筋肉、脾臓内などに注射、或いは経口的に投与し免疫する。ここで、免疫する哺乳動物は特に制限されず、後の操作において細胞融合に使用する骨髄腫細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、マウス、ラットなどが具体例として挙げられる。具体的には、感作抗原をPBS（P

50

hosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4～21日毎に数回投与する。

【0018】

次に、免疫動物から採取した脾臓細胞を、マウスなど哺乳動物の骨髄腫細胞（ミエロマ細胞）と融合させる。骨髄腫細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（HGPRT⁻）やチミジンキナーゼ欠損（TK⁻）等の適切なマーカーを有するものが好ましい。具体的には、マウスP3/NS1/1-Aq4-1、などが挙げられる。融合は、公知の手法に準じて行うことができる。また、融合促進剤としてポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等を用いることができる。脾臓細胞と骨髄腫細胞との混合比は1：1～10：1が好ましい。場合によっては、電気融合法等により細胞融合を行うこともできる。

10

【0019】

細胞融合した後、通常の見出し用培地で培養することによりハイブリドーマを選択的に得ることができ、そのコロニーが十分に大きくなったところで目的とする抗体を産生する株の検索及び単クローン化を行う。

ハイブリドーマのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロプレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の哺乳動物の免疫感作に用いた抗原に対する反応性を、一般に抗体の検出に用いられている方法、例えば酵素免疫測定法により測定することにより行うことができる。酵素免疫測定法としては、例えばELISA、RIAなどが挙げられる。ここで、ヒトCRPに加え、上記147～172領域のアミノ酸配列との反応性を評価することにより、本発明の抗体を産生するハイブリドーマを効率的に選択できる。

20

【0020】

選択されたハイブリドーマを単クローン化するには、例えば限界希釈法や軟寒天法により行うことができる。この際、フィーダーとしてマウス胸腺細胞や腹腔マクロファージ、あるいはこれらと同様の効果を有する公知の添加剤を用いることが好ましい。

【0021】

得られた単クローン化ハイブリドーマを用いて本発明の抗体を製造するには、当該ハイブリドーマを適当な培地中で培養するか、又はマウス等の腹腔内で培養すればよい。ここで用いられる培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であれば特に制限されず、例えば牛胎児血清、L-グルタミン、L-ピルビン酸及び抗生物質（ペニシリンGとストレプトマイシン）を含むRPMI 1640培地等が好適である。培養は、例えば上記ハイブリドーマを $10^4 \sim 10^5$ 個/ml濃度で培地に加え、5%炭酸ガス濃度、37℃の条件下で2～4日間程度行うのが好ましい。この培養により得られた上清を遠心分離等すれば、本発明の抗体を得ることができる。一方、腹腔内培養は、ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与し、その腹水を回収すればよい。

30

【0022】

培養上清中の本発明のモノクローナル抗体はこのままでも使用可能であるが、例えば硫酸沈澱による分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、プロテインA結合担体、抗IgG抗体カラム等によって精製して用いてもよい。

40

【0023】

本発明のポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体の公知な方法に従って調製される。すなわち、上記と同様な哺乳動物に、CRPのアミノ酸配列の147～172領域を含むペプチドを抗原として免疫し、製造されるヒトCRPに反応性を有する抗体を含む血清を採取することにより得ることができる。ポリクローナル抗体はそのまま使用できるが、上記と同様に精製して用いてもよい。

本発明の抗CRP抗体の特異性は、例えばウェスタンブロット法、ELISAなどにより確認できる。

【0024】

50

抗体の純度としては特に限定されず、例えばグロブリン画分であってもアフィニティ精製画分であってもよい。また、本発明の抗CRP抗体は、抗体の全体分子に限られず、CRPに結合する限り、抗体の断片またはその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。

【0025】

このようにして得られる本発明の抗CRP抗体は、被検試料中のヒトCRPの免疫学的測定に有用である。ここで、被検試料としては、CRPが含まれる可能性のある試料であれば特に制限されない。具体的な例としては、例えば血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、尿などを挙げることができる。また、生物の体から採取された細胞の培養液などの、被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。

10

【0026】

免疫学的測定法としては、特に制限されず、例えばオクタロニー法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法、酵素免疫測定法、ラテックス免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、フロロイムノアッセイなどを利用することができる。これらのうち、ELISA及びLPIA法に代表される凝集反応を利用したラテックス凝集法が好ましい。ここで、測定とは、定量的又は非定量的な測定を含み、例えば、非定量的な測定としては、生成した凝集物の度合いを目視で陰性(-)か陽性(+)かを判定する定性法が挙げられ、定量的な測定としては、CRPの濃度の測定、CRPの量の測定などを挙げることができる。

20

【0027】

本発明の抗CRP抗体は、必要に応じて標識物質で標識して用いることができる。標識物質としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素；³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹²⁵Iなどのラジオアイソトープ；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンなどの蛍光物質；ビオチン、アジピン、ジゴケシゲニンなどの化学物質などが挙げられる。

【0028】

標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、及び必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素を用い、発色剤としてo-フェニレンジアミン、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン、2,2'-アジノジ-〔3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸〕アンモニウム塩等；酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、基質として、p-ニトロフェニルフォスフェート、3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]}-4-イル)フェニルフォスフェート；AMPDP等；酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、基質として、 β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド等；酵素としてグルコースオキシダーゼを用いる場合には、ペルオキシダーゼの共存下で基質として、 β -D-グルコース、発色剤としてペルオキシダーゼの発色剤を用いることができる。

30

40

【0029】

使用する酵素標識抗体は公知の方法によって作成することができ、例えば中根らの方法(Nakane P. K et al, J. Histochem Cytochem, 22, 1084-1089, 1974)あるいは石川らの方法(マレイミド法：「酵素免疫測定法 第3版」医学書院)などに従い、断片化していない免疫グロブリン分子をそのままか、あるいは必要に応じて抗体を適当なプロテアーゼで限定分解してF(ab')₂、又はFab'とした後、酵素で標識することができる。

【0030】

また、本発明の抗CRP抗体は、不溶性担体に固定化し、固定化酵素として用いることもできる。不溶性担体としては、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンなどの各

50

種合成高分子、ガラス、シリコン、不溶性多糖（架橋デキストラン、ポリサッカライド）などが好ましく、これらの担体は球状、棒状、微粒子等の形状、あるいは試験管、マイクロプレートなどの形態で用いることができる。なお、不溶化抗体作成の条件としては、球状、棒状、試験管、マイクロプレートの形態の場合及び微粒子の形態の場合、抗体濃度は各々 $1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $1 \sim 10 \text{mg}/\text{ml}$ 、緩衝液はリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液などの $\text{pH} 7 \sim 10$ の中性からアルカリ性、室温又は 4°C で1時間～72時間で調製することが好ましい。

【0031】

抗CRP抗体とCRPとの結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、抗原抗体反応が起こり得る溶液であれば特に制限されないが、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス塩酸緩衝液、グッド緩衝液等が好ましい。反応における pH は、 $\text{pH} 7 \sim 9$ の範囲が好ましい。また、上記反応液に、感度向上、反応促進又は安定化を目的に、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プルラン等の水溶性高分子；ウシ血清アルブミン、シヨ糖等の安定剤；アジ化ナトリウム等の防腐剤；塩化ナトリウム等の添加剤等を適宜添加してもよい。

10

【0032】

本発明のCRP測定試薬には、抗CRP抗体の他に、非特異性反応の防止、保存安定性の点から、ウシ血清アルブミン、シヨ糖等を適宜溶解させてもよく、また塩濃度調整のために塩化ナトリウム等を溶解させてもよい。

さらに、本発明のCRP測定試薬は、抗CRP抗体を分散及び溶解させた1液型試薬であってもよく、2液型又は3液型試薬として使用してもよい。また、試薬には、キットも含まれ、該キットは、適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

20

【0033】

本発明のCRP測定試薬中のCRPに対する抗体の濃度としては、被検試料中のCRPを測定できる濃度であれば特に制限されないが、 $50 \sim 400 \mu\text{g}/\text{mL}$ とするのが好ましく、特に $100 \sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ とするのが好ましい。 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であると、感度が低いため、低濃度域での正確な定量ができにくく、他方 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ を超えると、非特異的な反応を生じ易い。

30

【0034】

従来のLPIAを利用したCRP定量法は、感度が $500 \text{ng}/\text{mL}$ 程度であり、局所的炎症や小部位の病変を捉えることはできなかったが、本発明においては、感度が $3 \sim 5 \text{ng}/\text{mL}$ と極めて高く、体内の極小さい炎症までも捉えることが可能である。従って、本発明のCRP測定試薬は、各種の感染症、炎症性疾患及び組織破壊をきたす疾患の診断や治療経過観察等に好適に用いられる。

そのような疾患の例としては、リウマチ、細菌性感染症、ウイルス性肝炎、肺炎、黄斑変性症、尿路感染症などの炎症、組織破壊性疾患、虚血性心疾患、新生児感染症、菌周病、口蓋扁桃腺の炎症悪化などが挙げられる。

【実施例】

【0035】

以下、本発明について実施例をあげて具体的に説明するが、本発明はこれらによって何等限定されるものではない。

40

【0036】

実施例1 抗CRP抗体の作製

〔rCRPの調製〕

(1) CRP遺伝子の調製

ヒト血液中の白血球成分からDNAの抽出を行った。全血に3倍量のEDTA溶液を加えてDNAを抽出した。このDNAを鋳型とし、CRPの遺伝子配列（J. Biol. Chem., 260, 13377-13383, 1985）をもとに構築した7種類のプライマーにより6種類の遺伝子断片をPCRにより増幅した。プライマーは、表1記載のM

50

K01 (配列番号2)、MK02 (配列番号3)、MK03 (配列番号4)、MK04 (配列番号5)、MK05 (配列番号6) 又はMK06 (配列番号7) のフォワードプライマー及びリバースプライマー (配列番号8) を用いた。

【0037】

【表1】

Forward & Reverse primer for recombinant CRP

Primer	Sequence	Tm(°C)	Length(bp)
MK01	5'-CACCCAGACAGACATGTCGAGGAAGGTT-3'	75.0	618
MK02	5'-CACCATGTCGAGGAAGGCTTTTG-3'	70.5	612
MK03	5'-CACCTCGTATGCCACCAAGAGACA-3'	71.1	465
MK04	5'-CACCAGGGTGAGGAAGAGTCTGAAG-3'	70.1	276
MK05	5'-CACCGAAGGAAGCCAGTCCCT-3'	70.6	183
MK06	5'-CACCACCATCTATCTTGGCGGG-3'	71.3	105
Reverse	5'-AAACCCCAGCTGTGGCCCTGA-3'	73.9	—

※Forward primer (MK01~MK06) はCRPの配列の前に遺伝子組換えに必要なCACCを付けたもの

【0038】

PCRにより増幅された6種類のDNA断片 (図1) を常法によりクリスタルバイオレットゲルを用いて精製した。

(2) 次に宿主細胞に大腸菌を用いた遺伝子組換えを行った。上記により得られたDNA断片を、pET-100/D-TOPO vector (Invitrogen) にそれぞれサブクロニングし、氷上で大腸菌宿主であるTop10にトランスフェクションしてLB Ampicillineプレートに全量を撒き、37℃で15時間インキュベートしてシングルコロニーを形成させた。生じたコロニーに目的のプラスミドが存在しているかどうかを調べるためにインサート遺伝子のプライマーを用いてコロニーPCRを行い、バンドが確認できたコロニーのみをLB Ampicillineプレートに継代し、37℃で15時間攪拌 (200rpm) 培養した。

【0039】

(3) 上記の操作によって得たプラスミドを大腸菌宿主であるBL21にトランスフェクションしてLB Ampicillineプレートに全量を撒き、37℃で15時間インキュベート (200rpm) してシングルコロニーを形成させた。コロニーを回収し、Ampicilline入りのLB培地に継代し、OD₆₀₀ = 0.5になった時点で培養液を2つに分けた。一方の培養液にのみ最終濃度が1.0mMになるようにIPTGを加え、部分組換えヒトCRPの発現を誘導した。その後1時間おきに培養液を採取した (0~5時間)。採取した培養液を16,000×g、1分で遠心した後得られたペレットを凍結した。

【0040】

(4) SDS-PAGEによる発現タンパク質の確認

上記で回収した大腸菌菌体ペレットをLysis bufferでタンパク質を溶解し

て液体窒素を用いた凍結融解で菌体を破碎し、遠心分離を行った。得られた上清とペレット中のタンパク質をSDS-PAGE電気泳動で確認した。

その結果、6種類の発現タンパクにおいてバンドを検出できた。発現タンパク質のバンドはMK01 26.7 kDa, MK02 26.3 kDa, MK03 19.9 kDa, MK04 11.7 kDa, MK05 6.8 kDa, MK06 4.0 kDaにHis tagタンパク質(4774 Da)が結合した分子量であり、この分子量とバンドの分子量はいずれも一致した。

【0041】

[抗体の作製]

上記で調製したrCRPをBalb/Cマウス(CRL)に免疫した。初回免疫には免疫タンパク質を100 µg/匹となるように調製し、FCA(フロイント完全アジュバント(H37 Ra)、Difco(3113-60)、ベクトンディッキンソン(cat #231131))を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。さらに、2週間後に免疫タンパク質を50 µg/匹となるように調製したものをFIA(フロイント不完全アジュバント、Difco(0639-60)、ベクトンディッキンソン(cat #263910))でエマルジョン化したものを皮下に投与した。以降1週間間隔で追加免疫を合計5回行った。最終免疫については、50 µg/匹となるようにPBSに希釈し尾静脈内に投与した。イムノプレートを用いたELISAによりCRPに対する血清中の抗体価が飽和しているのを確認後、マウスミエローマ細胞P3U1とマウス脾臓細胞を混合し、PEG1500(ロシュ・ダイアグノスティック、cat #783641)により細胞融合を行った。96穴培養プレートに播種し、翌日よりHAT培地で選択後培養上清をELISAでスクリーニングした。

陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した後、拡大培養を行い培養上清を回収した。ELISAによるスクリーニングは、CRPとの結合活性を指標に行い、強い結合能を有する抗CRPモノクローナル抗体を得た。

【0042】

抗体の精製はHi Trap Protein G HP(Amersham CAT#17-0404-01)を用いて行った。ハイブリドーマ培養上清を直接カラムにチャージし、結合バッファー(20 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0))にて洗浄後、溶出バッファー(0.1 M グリシン-HCl(pH 2.7))で溶出した。溶出は中和バッファー(1 M Tris-HCl(pH 9.0))を加えたチューブに行い直ちに中和した。抗体画分をプールした後、0.05% Tween 20/PBSで一昼夜透析を行いバッファー置換した。精製された抗体は0.02%となるようにNaN₃を添加した後、4℃で保管した。

得られたハイブリドーマのうち、モノクローナル抗体Lot. 050921を産生するハイブリドーマをCRP8と命名し、平成20年(2008)年8月28日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(住所:茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託した(受領番号:FERM ABP-11001)。

抗CRPモノクローナル抗体のアイソタイピングは、ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II(PIERCE CAT# 37502)を用い、方法は添付のマニュアルに従った。アイソタイピングの結果全てIgG1タイプであった。

得られた抗体のうち、抗CRPモノクローナル抗体Lot. 050921、Lot. 030700及びLot. CP80105を以下の実験に用いた。

【0043】

実施例2 [サンドイッチELISAによる抗体認識部位の確認]

実施例1で作製した抗CRPモノクローナル抗体のエピトープ解析を発現タンパク質(MK01~MK06)を用いて行った。

96wellプレートに炭酸ナトリウムBufferで10 µg/mlに希釈したキャプチャー抗体(抗CRP IgGウサギ血清)を1wellあたり50 µL添加し、37℃

で1時間静置した。抗体溶液を除き、6%ブロッキングBufferを1wellあたり100 μ l添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、Lysis Bufferで希釈した発現タンパク質(抗原)を1wellあたり50 μ l添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、PBSで0.5mg/mlに希釈した1次抗体(抗CRPモノクローナル抗体)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、PBSで0.1 μ g/mlに希釈した2次抗体(抗マウスIgGヤギ血清HRP標識抗体)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、発色液を1wellあたり50 μ l添加し、遮光して20分間静置した。発色を確認後、反応停止液(1N硫酸)50 μ lを発色液に加え、マイクロプレートリーダーで波長492nmで吸光度を測定した。

10

その結果、表2に示すように、Lot. 050921はMK06に対して反応を示さなかったことから、エピトープは配列番号1に示すアミノ酸配列、すなわちCRPのアミノ酸配列中147~172領域に存在することが判明した。また、Lot. 030700及びLot. CP80105のエピトープは、配列番号1に示すアミノ酸配列中173~206領域に存在することが判明した。

【0044】

【表2】

Result of ELISA with Cell line anti CRP IgG monoclonal

MoAb	Isotype	Reactivity with Recombinant CRP					
		ELISA					
		MK01	MK02	MK03	MK04	MK05	MK06
MoAb Lot.050921	IgG1 κ	+	+	+	+	+	-
MoAb Lot.030700	IgG1 κ	+	+	+	+	+	+
MoAb Lot.CP80105	IgG1 κ	+	+	+	+	+	+

20

【0045】

実施例3 [ウェスタンブロッティングによる抗CRP抗体の特異性の確認]

上記で得られた発現タンパクを12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、PVDFフィルターに転写し、1hブロッキングした。PBS-Tで洗浄後、PBS-Tで1.0 μ g/mlに希釈した抗CRPモノクローナル抗体を1時間反応させ、PBS-Tで洗浄後、PBS-Tで0.2 μ g/mlに希釈した抗マウスIgGヤギ血清HRP標識抗体を1時間反応させた。PBS-Tで洗浄後、化学発光検出試薬で感光させた。

30

その結果、表3から明らかのように、Lot. 050921はMK06に対して反応を示さなかったことから、エピトープは配列番号1に示すアミノ酸配列、すなわちCRPのアミノ酸配列中147~172領域に存在することが判明した。また、Lot. 030700及びLot. CP80105のエピトープは、配列番号1に示すアミノ酸配列中173~206領域に存在することが判明した。

40

【0046】

【表 3】

Result of Western Blot with cell line anti CRP IgG monoclonal

MoAb	Isotype	Reactivity with Recombinant CRP					
		Western Blot					
		MK01	MK02	MK03	MK04	MK05	MK06
MoAb Lot.050921	IgG1 κ	+	+	+	+	+	-
MoAb Lot.030700	IgG1 κ	+	+	+	+	+	+
MoAb Lot.CP80105	IgG1 κ	+	+	+	+	+	+

10

【0047】

試験例1 抗CRP抗体の評価

(1) Latex試薬の作製法

1%カルボキシル基修飾ラテックス粒子（「Immutex」JSR（株）社製）懸濁液に、20mg/mL濃度WSC溶液2.0mLと50mg/mL濃度NHS溶液0.23mLを攪拌しながら順に加え、ラテックス表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後、遠心分離（16000rpm、4℃、20min）し、上澄みと沈殿に分け、沈殿物を上記MES緩衝液で洗浄した。これに0.5mgの抗CRPモノクローナル抗体（Lot.050921, 030700, CP80105）を加え、37℃で30分間攪拌した。攪拌後遠心分離（16000rpm、4℃、20min）し、上澄みと沈殿に分けた。上澄みは後の操作でラテックス粒子への抗CRP抗体結合量の定量に使用した。

20

沈殿を、上記MES緩衝液に懸濁し、変性BSAを1mL加え、25℃で30分間攪拌し、ラテックス粒子表面の抗CRP抗体結合部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、0.1M Tris-HCl緩衝液（pH8.2）2.0mLに懸濁し、抗CRPモノクローナル抗体感作Latex試薬とした。

【0048】

(2) Latex試薬の評価

上記(1)で作製したLatex試薬を用い、実施例1で得たrCRPの検出を行った。測定にはLPIA-500（三菱化学ヤトロン社製）を用い、波長800nmで凝集速度を測定した。この時、抗原濃度を0~100mg/mlに設定して測定を行った。CRP定量と検出限界の測定は、ラテックス試薬の平均反応速度から検量線を作成し、それをもとに行った。

30

その結果、図2に示すように、Lot.050921感作Latex試薬は3ng/mlから0.0596mg/mlと、高感度で安定した測定値を示した。また、Lot.CP80105感作Latex試薬は0.0002から0.0313mg/mlであり、Lot.030700感作Latex試薬は0.0002から0.005mg/mlであった。

【0049】

試験例2 ヒト血清中CRP測定

上記で作製したLatex試薬（Lot.050921及びCP80105）を用いて、肝疾患患者から採血して得られた血清30mL中のCRP濃度を測定した。各抗CRPモノクローナル感作Latex試薬の測定結果を、抗CRPポリクローナル抗体感作Latex試薬（抗CRP PoAb感作Latex試薬）での測定結果と比較した。

その結果、図3に示すように、肝疾患検体におけるLot.050921抗CRPモノクローナル抗体感作Latex試薬では、同検体の測定値が抗CRP PoAb感作Latex試薬の約半分ほどになっている。これは抗CRP PoAb感作Latex試薬には多数のエピトープがあり他の物質と非特異的な反応を示す可能性があるのに対し、本発明の抗体は、1つのエピトープとのみ特異的な反応を示すことに起因していると考えられ

40

50

る。また、Lot. CP80105抗CRPモノクローナル抗体感作Latex試薬と比較しても反応性が高いことがわかる。

【図1】

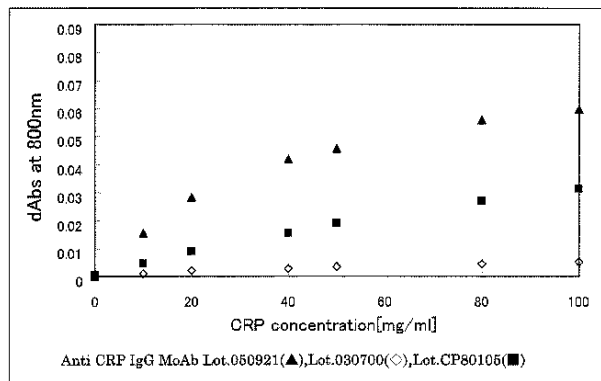
```

1      10      20      30      40      50
TTTGCITCCG CTCITCCCGA AGCCTGTGACA CCTGCCCCAA CAAGCAATGT
60      70      80      90      100
TGGAAANTTA TTTACATAGT GCGCGAAACT CCGTTACTGC TTGGATATA
110     120     130     140     150
AATCCAGGCA GGAGGAGTA CCTCTAAGGC AAGAGATCTG GGACTCTAG
160     170     180     190     200
CCCCGAACT TTCAGCCGAA TACATCTTTT CCAAGGAGT GAATTCAGGC
210     220     230     240     250
CCTTGATACA CTGGCAGCAG GACGTGACCA TGGAGAAGCT GTTGTGTTTC
260     270     280 MKF-01 290 ↓
TTGGTCTTGA CCAGCCCTTC TCATGCTTTT GGCCAGACAG GTAAGGACCA
310     320     330     340     350
CCCCAGGCTA TGGGAGATT TTGATCTGAG GTATGGGGGT GGGTCTAAG
360     370     380     390     400
ACTGCATGAA CAGTCTGAAA AAAAAAAAAA AAAGACTGTA TGAACGAGAC
410     420     430     440     450
AGTGGAGCAZ CTTTCATGGT GTTGTGTGTGT GTTGTGTGTGT GTTGTGTGTGT
460     470     480     490     500
TGTGTAACTG GAGAGGGGTT CAGTCTGTTT CTCATCTTAA AATTCATAC
510     520     530     540     550
GTAAGTAAAG GGTATAGATCT GTTGTGATCTG AGAAACCTCT CACATTTGCT
560     570     580     590     600
TTTTTTCTG GCTCAGAGAC ATGTCCAGGA AGGCTTTTGT GPTTCCCAA
610     620 MKF-02 630     640     650
GAGTCGGATA CTTCTATGTT ATGCTTCAA GCACCGTTAA CGAAGCCCTT
660     670     680     690     700
CAAAGCCCTC ACTGTGTGCC TCCACTTCTA CAGGAACTG TCCTCGACCC
710     720     730     740     750
GTGGGTACAG IATTTTCTCG TATTGACCCA AGAGACAAGA CAATGAGATT
760     770 MKF-03 780     790     800
CTCATATATT GGTCTAAGGA TATAGGATAC AGTTTACAG TGGGTGGGTC
810     820     830     840     850
TGAATATTA TTGGAGGTTT CTGAAATCAC AGTAGCTCCA GTACACATT
860     870     880     890     900
GTACAAGCTG GGAGTCCGCC TCAGGGATCG TGGACTCTG GGTAGATGGG
910     920     930     940     950
AAGCCCAAGG TTAGGAGAGG TCTGAGAGAG GGATACACTG TGGGGGACAG
960 MKF-04 970     980     990     1000
AGCAAGCATC ATCTTGGGCG AGGAGCAGGA TTCTTCGCT GCGAACTTTC
1010     1020     1030     1040     1050
AAGGAGGCTA GTCCCTGGGT GGAGACATCG GAAATGTGAA CATTTGGGAC
MKF-05 1060     1070     1080     1090     1100
TTTGTGCTGT CACCGATGA GATTAACACC ATCTATCTTG GCGGGCCCTT
1110     1120 MKF-06 1130     1140     1150
CAGTCTTAAT GTCTGAACT GCGGGGCACT GAAGTATGAA GTGCAAGCGG
1160     1170     1180
AAGTGTTCAC CAAACCCGAG CTGGGGCCCT
MKF-01

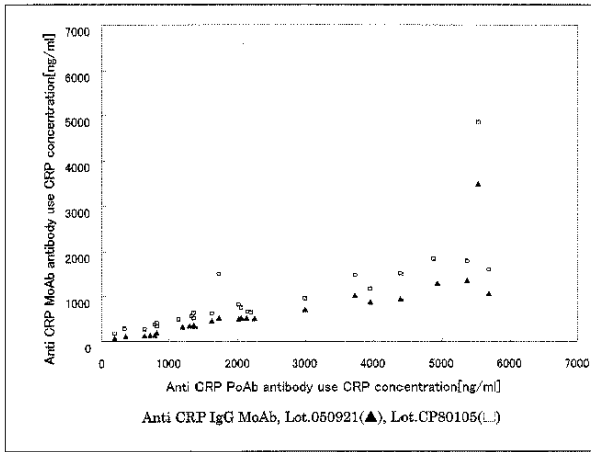
```

※MKF-01は矢印まで

【図2】



【図 3】



【配列表】

2009107170000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C07K16/18, C12N5/10, C12N15/02, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/577, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 91/000872 A (RUSH PRESBYTHRIAN ST LUKE MEDICAL CENT), 24 January, 1991 (24.01.91), & AU 9063524 A & EP 479922 A & JP 04-505857 A & AU 642430 B & US 5272258 A & EP 479922 A4 & CA 2057058 C	1-10
Y	LEI, K.J. et al, Genomic DNA sequence for human C-reactive protein, J Biol Chem, 1985, Vol.260, No.24, p.13377-83	1-10
Y	Maho KIKUCHI et al., "Epitope Kaisekiho o Riyo shita CRP(C-reactive protein) no Kenshutsu", The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 12 March, 2007 (12.03.07), Vol.87th, No.2, page 1470	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 September, 2008 (16.09.08)		Date of mailing of the international search report 22 September, 2008 (22.09.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002376

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Maho KIKUCHI et al., "Epitope Kaisekiho o Riyo shita CRP no Teiryo", The Japan Society for Clinical Laboratory Automation Dai 39 Kai Taikai Shorokushu, 01 September, 2007 (01.09.07), page 434	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 0 2 3 7 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C07K16/18, C12N5/10, C12N15/02, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/577, C12P21/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	WO 91/000872 A (RUSH PRESBYTERIAN ST LUKE MEDICAL CENT) 1991.01.24, & AU 9063524 A & EP 479922 A & JP 04-505857 A & AU 642430 B & US 5272258 A & EP 479922 A4 & CA 2057058 C	1-10	
Y	LEI, K. J. et al, Genomic DNA sequence for human C-reactive protein, J Biol Chem, 1985, Vol. 260, No. 24, p. 13377-83	1-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日に後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 16.09.2008		国際調査報告の発送日 22.09.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美	4 B 2936
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 0 2 3 7 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	菊地菜甫, 他, Epitope 解析法を利用した CRP (C-reactive protein) の検出, 日本化学会講演予稿集, 2007.03.12, Vol.87th, No.2, p.1470	1-10
X	菊地菜甫, 他, Epitope 解析法を利用した CRP の定量, 日本臨床検査自動化学会第 39 会大会抄録集, 2007.09.01, p.434	1-10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 0 1 A
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 神野 英毅
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

(72)発明者 菊地 菜甫
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

(72)発明者 小森谷 友絵
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 BA53 CA04 DA06 EA04 GA01 GA11
4B064 AG27 CA20 CE12 DA13
4B065 AA90X AB02 BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗CRP抗体及其用途		
公开(公告)号	JPWO2009107170A1	公开(公告)日	2011-06-30
申请号	JP2010500454	申请日	2008-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人日本大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人日本大学		
[标]发明人	神野英毅 菊地茉甫 小森谷友絵		
发明人	神野 英毅 菊地 茉甫 小森谷 友絵		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/68 C07K16/18 G01N2333/4737		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N15/00.C C12N5/00.102 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008051165 2008-02-29 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种专门识别测试样品中CRP并以高灵敏度进行测量的方法。与C反应蛋白(以下称为CRP)反应并识别SEQ ID NO:1所示CRP氨基酸序列的147至172区中存在的表位的抗CRP抗体。

[图 2]

