



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104011206 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201280063995.5

(22)申请日 2012.12.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104011206 A

(43)申请公布日 2014.08.27

(30)优先权数据

2011-281811 2011.12.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.06.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/083206 2012.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/094723 JA 2013.06.27

(73)专利权人 安斯泰来制药株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 岩崎正司 守屋隆一 吉野正康

高仓浩二

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 金龙河 穆德骏

(51)Int.Cl.

C12N 15/09(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/02(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

(56)对比文件

CN 1829740 A, 2006.09.06,

WO 2007/066823 A1, 2007.06.14,

JP 2002-532082 A, 2002.10.02,

WO 2010/053751 A1, 2010.05.14,

JP 2004-524841 A, 2004.08.19,

审查员 张锦广

权利要求书1页 说明书15页

序列表19页

(54)发明名称

新型抗人CTGF抗体

(57)摘要

本发明提供与以往的抗人CTGF抗体相比在结合活性和/或中和活性方面优良的抗人CTGF抗体、以及使用该抗人CTGF抗体的包括慢性肾病、糖尿病性肾病等肾疾病的人CTGF参与病态形成的各种疾病的预防或治疗手段。一种抗人CTGF抗体,其包含由序列号10所示的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号4所示的氨基酸序列构成的轻链可变区。

1. 一种抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段,其包含由序列号10所示的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号4所示的氨基酸序列构成的轻链可变区。

2. 如权利要求1所述的抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段的重链恒定区为人Ig γ 1恒定区。

3. 如权利要求1所述的抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段的轻链恒定区为人Ig κ 恒定区。

4. 如权利要求1所述的抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段,其中,所述抗体或抗体片段的重链恒定区为人Ig γ 1恒定区,所述抗体或抗体片段的轻链恒定区为人Ig κ 恒定区。

5. 如权利要求1所述的抗人CTGF抗体片段,其为单链可变区片段、Fab、Fab'或F(ab')₂。

6. 如权利要求5所述的抗人CTGF抗体片段,其与其他肽或蛋白质融合、或者被修饰剂修饰。

7. 如权利要求1所述的抗人CTGF抗体,其包含由序列号12所示的氨基酸序列构成的重链和由序列号8所示的氨基酸序列构成的轻链。

8. 一种表达载体,其含有包含编码权利要求1所述的抗体或抗体片段的重链可变区的序列的多核苷酸以及包含编码该抗体或抗体片段的轻链可变区的序列的多核苷酸。

9. 一种宿主细胞,其选自由以下的(a)和(b)组成的组:

(a) 经含有包含编码权利要求1所述的抗体或抗体片段的重链可变区的序列的多核苷酸和包含编码该抗体或抗体片段的轻链可变区的序列的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞;和

(b) 经含有包含编码权利要求1所述的抗体或抗体片段的重链可变区的序列的多核苷酸的表达载体和含有包含编码该抗体或抗体片段的轻链可变区的序列的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞。

10. 一种宿主细胞,其选自由以下的(a)和(b)组成的组:

(a) 经含有包含编码权利要求7所述的抗体的重链的序列的多核苷酸和包含编码该抗体的轻链的序列的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞;和

(b) 经含有包含编码权利要求7所述的抗体的重链的序列的多核苷酸的表达载体和含有包含编码该抗体的轻链的序列的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞。

11. 一种生产抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段的方法,其包含对权利要求9所述的宿主细胞进行培养以使其表达抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段的步骤。

12. 一种生产抗人CTGF抗体的方法,其包含对权利要求10所述的宿主细胞进行培养以使其表达抗人CTGF抗体的步骤。

13. 由权利要求11所述的方法生产的抗人CTGF抗体或抗人CTGF抗体片段。

14. 如权利要求13所述的抗人CTGF抗体片段,其为单链可变区片段、Fab、Fab'或F(ab')₂。

15. 如权利要求14所述的抗人CTGF抗体片段,其与其他肽或蛋白质融合、或者被修饰剂修饰。

16. 由权利要求12所述的方法生产的抗人CTGF抗体。

新型抗人CTGF抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及新型抗人CTGF抗体。详细而言,本发明的新型抗人CTGF抗体是与以往的抗人CTGF抗体相比在结合活性和/或中和活性方面优良的抗人CTGF抗体。

背景技术

[0002] CTGF(结缔组织生长因子)是属于CCN家族的分子量约36~38kDa的富含半胱氨酸残基的分泌蛋白质(非专利文献1),以往,已知由被认为是对纤维化最重要的增殖因子的TGF- β 诱导(非专利文献2)。因此,推测TGF- β 诱导CTGF,诱导出的CTGF促进器官、组织的纤维化,CTGF被认为对纤维化、细胞的增殖、细胞外基质的代谢、血管形成、动脉硬化等发挥重要的作用(非专利文献3)。

[0003] 已知CTGF中存在多个结构域,并且与其他因子相互作用。其中,已经揭示出CTGF通过血管性血友病因子C结构域与TGF- β 或BMP4直接结合,引起TGF- β 信号传递的促进或BMP信号传递的抑制(非专利文献4)。

[0004] CTGF在各种肾病(例如,慢性肾病、糖尿病性肾病、肾小球硬化症、IgA肾病、局灶节段性肾小球硬化症、ANCA相关性肾炎、急进性肾小球肾炎、慢性移植肾病、肾病综合征、狼疮肾炎、膜增生性肾小球肾炎)中表达亢进(非专利文献5),有报道称其与纤维化密切相关(非专利文献6)。

[0005] 另外,报道了CTGF与各种纤维化病(硬皮病、间质性肺病、特发性肺纤维化等肺纤维化病、由慢性B型或C型肝炎产生的纤维化病、放射线诱导性纤维化病、由创伤愈合产生的纤维化病、以及心脏的肥大和纤维化病)、血管增生性疾病、糖尿病性视网膜病、癌症等相关,将其视为新的治疗标靶(非专利文献7、8)。

[0006] 因此,如果能够开发具有与CTGF特异性地结合而阻碍CTGF所带来的各种作用的活性的单克隆抗体,则可望用于CTGF参与病态形成的各种疾病的诊断、预防或治疗。

[0007] 作为到目前为止进行了研究的对人CTGF显示功能抑制作用的抗体,报道了作为人单克隆抗体的M84和M320(专利文献1)、CLN1(专利文献2)、作为小鼠单克隆抗体的CTGF-m2-1(专利文献3)等。其中,对CLN1进行了最详细的研究,在间质性肺纤维化模型、由单侧输尿管结扎导致的肾间质纤维化模型中,其效果明确。CLN1目前作为FG-3019正处于临床试验(II期)阶段。

[0008] 但是,以往的抗体对CTGF的结合活性称不上充分,从治疗有效性的观点考虑,对CTGF的中和活性称不上足够强。

[0009] 作为规定抗体药物的有效给药量的主要因素,一般可以列举抗体所具有的对抗原的结合活性和中和活性、体内存在的抗原的量,提高结合活性或中和活性使给药量降低,结果会降低患者的经济负担和医疗成本,可以说是极为有益的改良。

[0010] 鉴于上述情况,获得结合活性、中和活性比以往的抗体强的抗人CTGF抗体对用于CTGF参与病态形成的各种疾病的预防或治疗是必不可缺的。

[0011] 现有技术文献

- [0012] 专利文献
- [0013] 专利文献1:日本特开2000-232884
- [0014] 专利文献2:W02004/108764
- [0015] 专利文献3:W02007/066823
- [0016] 非专利文献
- [0017] 非专利文献1:D.M.Bradham et al,J.Cell Biol.114:1285-1294(1991)
- [0018] 非专利文献2:A.Igarashi et al,Mol.Biol.Cell4:637-645(1993)
- [0019] 非专利文献3:Blom IE et al,Matrix Biol.21(6):473-82(2002)
- [0020] 非专利文献4:Abreu,et al.Nat.Cell.Biol.4,599-604(2002)
- [0021] 非专利文献5:Ito Y et al.:Kidney Int.53(4)853-61,(1998)
- [0022] 非专利文献6:Phanish MK et al,Nephron Exp Nephrol.114(3)e83-92,(2010)
- [0023] 非专利文献7:Shi-Wen X et al,Cytokine Growth Factor Rev.19(2):133-44.(2008)
- [0024] 非专利文献8:Jun JI et al,Nat Rev Drug Discov.10(12):945-63(2011)

发明内容

- [0025] 发明所要解决的问题
- [0026] 本发明的课题在于提供与以往的抗人CTGF抗体相比在结合活性和/或中和活性上优良的抗人CTGF抗体。
- [0027] 用于解决问题的方法
- [0028] 本发明包含以下的发明作为医学上或产业上有用的物质/方法。
- [0029] [1]一种抗人CTGF抗体,其包含由序列号10所示的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号4所示的氨基酸序列构成的轻链可变区。
- [0030] [2]如[1]所述的抗人CTGF抗体,其中,上述抗体的重链恒定区为人Ig γ 1恒定区。
- [0031] [3]如[1]所述的抗人CTGF抗体,其中,上述抗体的轻链恒定区为人Ig κ 恒定区。
- [0032] [4]如[1]所述的抗人CTGF抗体,其中,上述抗体的重链恒定区为人Ig γ 1恒定区,上述抗体的轻链恒定区为人Ig κ 恒定区。
- [0033] [5]如[1]所述的抗人CTGF抗体,其包含由序列号12所示的氨基酸序列构成的重链和由序列号8所示的氨基酸序列构成的轻链。
- [0034] [6]一种多核苷酸,其包含编码[1]~[5]中任一项所述的抗体的重链可变区的序列。
- [0035] [7]一种多核苷酸,其包含编码[1]~[5]中任一项所述的抗体的轻链可变区的序列。
- [0036] [8]一种表达载体,其包含[6]和/或[7]所述的多核苷酸。
- [0037] [9]一种经[8]所述的表达载体转化的宿主细胞。
- [0038] [10]如[9]所述的宿主细胞,其选自由以下的(a)和(b)组成的组:
- [0039] (a)经含有包含编码[1]~[5]中任一项所述的抗体的重链可变区的序列的多核苷酸和包含编码该抗体的轻链可变区的序列的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞;和
- [0040] (b)经含有包含编码[1]~[5]中任一项所述的抗体的重链可变区的序列的多核

苷酸的表达载体和含有包含编码该抗体的轻链可变区的序列的多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞。

[0041] [11]一种生产[1]~[5]中任一项所述的抗人CTGF抗体的方法,其包含对[9]或[10]所述的宿主细胞进行培养以使其表达抗人CTGF抗体的步骤。

[0042] [12]一种人CTGF参与病态形成的疾病的治疗药,其包含[1]~[5]中任一项所述的抗体。

[0043] [13]如[12]所述的治疗药,其中,上述疾病为肾疾病。

[0044] [14]如[13]所述的治疗药,其中,上述肾疾病为慢性肾病或糖尿病性肾病。

[0045] [15]一种用于预防或处置人CTGF参与病态形成的疾病的方法,其包含施用[1]~[5]中任一项所述的抗体的步骤。

[0046] [16]如[15]所述的方法,其中,上述疾病为肾疾病。

[0047] [17]如[16]所述的方法,其中,上述肾疾病为慢性肾病或糖尿病性肾病。

[0048] [18]用于在人CTGF参与病态形成的疾病的预防或处置中使用的、[1]~[5]中任一项所述的抗体。

[0049] [19]如[18]所述的抗体,其中,上述疾病为肾疾病。

[0050] [20]如[19]所述的抗体,其中,上述肾疾病为慢性肾病或糖尿病性肾病。

[0051] 发明效果

[0052] 根据本发明,提供与以往的抗人CTGF抗体相比在结合活性和/或中和活性上优良的抗人CTGF抗体。本发明的抗人CTGF抗体通过抑制人CTGF的功能而具有强力的抗纤维化作用,对于人CTGF参与病态形成的各种疾病的预防或治疗有用。而且,这种本发明的抗人CTGF抗体带来给药量的降低、给药间隔的扩大、给药方法的改善(例如,皮下注射剂)等临床应用上的优良改善,大大有助于改善治疗有效性和患者依从性。

具体实施方式

[0053] 以下,对本发明进行详述。

[0054] 本发明人对抗人CTGF抗体的制作进行了大量的创意研究,结果成功地制作了与以往的抗人CTGF抗体相比结合活性得到改善、中和活性优良的抗人CTGF抗体。

[0055] 抗体分子的基本结构在各类中是共通的,由分子量5万~7万的重链和2~3万的轻链构成。重链通常由含有约440个氨基酸的多肽链构成,在各类中具有特征性的结构,与IgG、IgM、IgA、IgD、IgE相对应被称为 γ 链、 μ 链、 α 链、 δ 链、 ϵ 链。而且IgG中存在IgG1、IgG2、IgG3、IgG4,分别被称为 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 。轻链通常由含有约220个氨基酸的多肽链构成,已知有L型和K型两种,分别被称为 λ 链、 κ 链。抗体分子的基本结构的肽构成由各自相同的2条重链和2条轻链通过二硫键(S-S键)和非共价键结合而成,分子量为15万~19万。2种轻链与任一种重链均能够成对。各个抗体分子常常由相同的2条轻链和相同的2条重链形成。

[0056] 链内S-S键在重链中有四个(μ 、 ϵ 链中有五个),在轻链中有两个,每100~110个氨基酸残基形成一个环,该立体结构在各环间类似,被称为结构单元或结构域。对于在重链、轻链中均位于N末端的结构域而言,即使是来自于同种动物的同一类(亚类)的标准品,其氨基酸序列也不固定,被称为可变区,各结构域分别被称为重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。比可变区更靠C末端侧的氨基酸序列在各类或亚类中基本固定,被称为恒定区(各结

构域分别表示为C_H1、C_H2、C_H3或C_L)。

[0057] 抗体的抗原决定部位由V_H和V_L构成,结合的特异性由该部位的氨基酸序列决定。另一方面,与补体或各种细胞的结合等生物学活性反映出各类Ig的恒定区的结构的差异。已知轻链和重链的可变区的可变性基本限定在任一种链中均存在的3个小的超变区内,将这些区域称为互补决定区(CDR;从N末端侧起分别为CDR1、CDR2、CDR3)。可变区的其余部分被称为框架区(FR),比较恒定。

[0058] 本发明人成功制作的本发明的抗人CTGF抗体为具有以下特征的抗人CTGF抗体。

[0059] 一种抗人CTGF抗体,其包含由序列号10所示的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号4所示的氨基酸序列构成的轻链可变区。

[0060] 具体而言,本发明人使用人单克隆抗体开发技术“VelocImmune”(VelocImmune antibody technology;Regeneron公司(美国专利6596541号))小鼠制作抗体,通过使用各种生物学活性试验和物性试验的抗体的筛选,成功地鉴定了本发明的抗人CTGF抗体。在VelocImmune技术中,将内源性的免疫球蛋白重链和轻链的可变区由对应的人可变区置换的转基因小鼠用目标抗原(例如,人CTGF)免疫后,获得表达抗体的小鼠的淋巴系细胞,与小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合,由此制作杂交瘤。接着,就是否产生与目标抗原特异性地结合的抗体对该杂交瘤细胞进行筛选。在此产生的抗体为具有人抗体的可变区和小鼠抗体的恒定区的抗体(也称为嵌合抗体)。接着,在鉴定出与目标抗原特异性地结合的抗体的情况下,从该杂交瘤细胞中分离编码抗体的重链和轻链的可变区的DNA,将该DNA与编码期望类别的人抗体重链和轻链的恒定区的DNA连接。使如此得到的编码重链和轻链的基因在细胞内(例如,CHO细胞)表达,产生抗体分子。通过该方法制作的抗体的重链和轻链为来源于人免疫球蛋白基因的“完全人型”抗体的重链和轻链。

[0061] 本发明的抗人CTGF抗体可以由本领域技术人员基于本申请说明书中公开的、其重链可变区和轻链可变区的序列信息,使用该领域中公知的方法容易地制作。本发明的抗人CTGF抗体可以优选将其重链可变区和轻链可变区与人抗体的重链恒定区和轻链恒定区分别连接而以完全人型抗体的形式进行制作。具体而言,制作具有编码本发明的抗体的重链可变区氨基酸(序列号10)的碱基序列的重链可变区基因片段和具有编码本发明的抗体的轻链可变区氨基酸(序列号4)的碱基序列的轻链可变区基因片段。然后,将该可变区基因与人抗体的适当类别的恒定区基因连接而制作完全人型抗体基因。接着,将该抗体基因与适当的表达载体连接,导入培养细胞中。最后,对该培养细胞进行培养,可以从培养上清中得到单克隆抗体。

[0062] 编码本发明的抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸的基因片段例如可以基于依据该重链和轻链可变区的氨基酸序列而设计的碱基序列,利用该领域中公知的基因合成方法进行合成。作为这样的基因合成方法,可以使用W090/07861中记载的抗体基因的合成方法等本领域技术人员公知的各种方法。

[0063] 接着,将上述的可变区基因片段与人抗体的恒定区基因连接而制作完全人型抗体基因。使用的人抗体的恒定区可以选择任何一种亚类的恒定区(例如,作为重链的 γ 1、 γ 2、 γ 3或 γ 4、作为轻链的 λ 链或 κ 链的恒定区),作为重链恒定区,可以优选使用人Ig γ 1,另外,作为轻链恒定区,可以优选使用人Ig κ 。

[0064] 对于在该完全人型抗体基因的制作之后的抗体基因向表达载体中的导入、表达载

体向培养细胞中的导入、培养细胞的培养、抗体的纯化等,可以使用该领域中公知的各种方法进行。

[0065] 作为与如上所述得到的抗体基因连接的表达载体,可以列举例如GS载体pEE6.4、pEE12.4(Lonza Biologics公司),只要是能够表达抗体基因的表达载体,则没有特别限制。另外,也可以利用AG- γ 1、AG- κ (例如,参考W094/20632)等预先具有人Ig恒定区基因的表达载体。

[0066] 上述的表达载体通过例如磷酸钙法、电穿孔法等被导入培养细胞中。

[0067] 作为导入表达载体的培养细胞,可以使用例如CHO-K1SV细胞、CHO-DG44细胞、293细胞等培养细胞,将其通过常规方法进行培养即可。

[0068] 上述培养后,蓄积在培养上清中的抗体可以通过各种柱层析、例如使用蛋白A柱或蛋白G柱的各种层析进行纯化。

[0069] 本发明的抗人CTGF抗体为与人CTGF结合的抗体。作为测定所得到的抗人CTGF抗体对人CTGF的结合活性的方法,有ELISA、表面等离子共振(SPR)分析等方法。例如,在使用ELISA的情况下,将人CTGF(序列号14)固定在ELISA板上,向其中添加抗人CTGF抗体使其反应后,使用辣根过氧化物酶(HRP)等酶标记的抗IgG抗体等二次抗体进行反应,清洗后,加入显色底物(例如,HRP标记的情况下为TMB显色试剂),测定吸光度。另外,可以利用SPR分析,更详细地测定对人CTGF的结合活性。在进行SPR分析的情况下,例如,可以通过使用Biacore系统测定抗人CTGF抗体与人CTGF的结合速率常数(k_a)和解离速率常数(k_d),由2个常数的比算出解离常数(KD)。本发明的抗人CTGF抗体中也包括与来源于其它动物的CTGF(例如,小鼠CTGF)结合的抗体,也可以测定对这些蛋白质的结合活性。

[0070] 另外,本发明的抗人CTGF抗体对人CTGF具有中和活性。在本说明书中使用的情况下,抗体的“中和活性”是指通过与CTGF结合,抑制介由CTGF所带来的任意生物活性的活性,可以将CTGF的1个或多个生物活性作为指标来进行评价。作为这样的中和活性,可以列举例如肾来源的成纤维细胞中的胶原蛋白合成抑制(纤维化抑制)作用,可以通过使用后述实施例中记载的方法进行评价。

[0071] 为了更详细地评价本发明的抗人CTGF抗体的效果,也可以使用抗体的体内药效试验。例如,可以通过后述实施例中记载的使用小鼠慢性肾病模型、大鼠肾炎模型的肾功能评价来评价抗体在体内的药效。

[0072] 此外,作为评价本发明的抗人CTGF抗体的各种稳定性(例如,热稳定性、长期保存稳定性、高浓度稳定性)的方法,可以列举例如利用差示扫描量热测定、保存中凝集体形成测定的方法。

[0073] 本发明的抗人CTGF抗体可以优选通过如下方法容易地获得:使用该领域中公知的方法,合成包含编码序列号10所示的重链可变区氨基酸序列的碱基序列的DNA和包含编码序列号4所示的轻链可变区氨基酸序列的碱基序列的DNA,将这些DNA与适当类别的人抗体恒定区基因、对于重链而言优选人Ig γ 1恒定区基因、对于轻链而言优选人Ig κ 恒定区基因连接,构建完全人型抗体基因,使用该领域中公知的各种方法,将该完全人型抗体基因导入表达载体,将该表达载体导入培养细胞并对该培养细胞进行培养,从所得到的培养物中纯化抗体。包含编码序列号10所示的重链可变区氨基酸序列的碱基序列的DNA优选包含序列号9所示的碱基序列。包含编码序列号4所示的轻链可变区氨基酸序列的碱基序列的DNA优

选包含序列号3所示的碱基序列。

[0074] 包含序列号10所示的重链可变区和人Ig γ 1恒定区的本发明的优选的抗人CTGF抗体重链为由序列号12所示的氨基酸序列构成的重链。包含序列号4所示的轻链可变区和人Ig κ 恒定区的本发明的优选的抗人CTGF抗体轻链为由序列号8所示的氨基酸序列构成的轻链。包含编码由序列号12所示的氨基酸序列构成的抗人CTGF抗体重链的碱基序列的DNA优选包含序列号11所示的碱基序列。包含编码由序列号8所示的氨基酸序列构成的抗人CTGF抗体轻链的碱基序列的DNA优选包含序列号7所示的碱基序列。作为包含由序列号12所示的氨基酸序列构成的重链和由序列号8所示的氨基酸序列构成的轻链的本发明的抗人CTGF抗体,可以列举后述实施例中记载的完全人型37-45-MH1。

[0075] 本发明也包括含有包含由序列号10的第31~35位的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号10的第50~66位的氨基酸序列构成的CDR2、由序列号10的第99~108位的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区和包含由序列号4的第24~35位的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的第51~57位的氨基酸序列构成的CDR2、由序列号4的第90~98位的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗人CTGF抗体。这样的抗人CTGF抗体也可以由本领域技术人员按照前述的步骤容易地制作。

[0076] 本发明也包含含有本发明的抗体的重链可变区和轻链可变区且保持活性的单链可变区片段(scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂等抗人CTGF抗体片段。另外,本领域技术人员也可以基于本发明制作该抗人CTGF抗体或抗体片段与其他肽或蛋白质的融合抗体,或者制作结合有修饰剂的修饰抗体。用于融合的其他肽或蛋白质只要不会使抗体的结合活性降低,则没有特别限定,可以列举例如:人血清白蛋白、各种标签肽、人工螺旋基序肽、麦芽糖结合蛋白质、谷胱甘肽S转移酶、各种毒素、其他能够促进多聚体化的肽或蛋白质等。用于修饰的修饰剂只要不会使抗体的结合活性降低,则没有特别限定,可以列举例如:聚乙二醇、糖链、磷脂、核糖体、低分子化合物等。

[0077] 如此得到的本发明的抗人CTGF抗体根据需要纯化后,按照常规方法制剂化,可以用于慢性肾病、糖尿病性肾病等肾疾病、血管增生性疾病、心肌病、肝脏的纤维增生疾病、肺纤维化病、皮肤纤维化疾病、糖尿病性视网膜病、癌症等CTGF参与病态形成的疾病的预防、治疗。

[0078] 本发明的抗人CTGF抗体可以优选作为肾疾病治疗剂使用,更优选作为慢性肾病或糖尿病性肾病的治疗剂使用。作为这些治疗剂等的剂型的例子,可以为注射剂、点滴用剂等非口服制剂,优选通过静脉内给药、皮下给药等进行给药。另外,制剂化时,可以在药理学上允许的范围内使用与这些剂型相应的载体、添加剂。

[0079] 上述制剂化时的本发明的抗人CTGF抗体的添加量根据患者的症状的程度和年龄、使用的制剂的剂型或抗体的结合效价等而异,例如,可以使用约0.001mg/kg至约100mg/kg。

[0080] 本发明还提供包含编码本发明的抗人CTGF抗体的序列的多核苷酸和包含该多核苷酸的表达载体。本发明还提供包含编码本发明的抗人CTGF抗体的重链可变区的序列的多核苷酸、包含编码本发明的抗CTGF抗体的轻链可变区的序列的多核苷酸、以及包含这些多核苷酸中的任意一者或两者的表达载体。本发明的表达载体只要能够在原核细胞和/或真核细胞的各种宿主细胞中表达编码本发明的抗体或其重链可变区和/或轻链可变区的基因并且能够产生这些多肽,则没有特别限制。可以列举例如:质粒载体、病毒载体(例如,腺病

毒、逆转录病毒)等。本发明的表达载体优选含有上述的包含编码本发明的抗体的重链或轻链的序列的多核苷酸,或者含有包含编码本发明的抗体的重链的序列的多核苷酸和包含编码本发明的抗体的轻链的序列的多核苷酸这两者。

[0081] 本发明的表达载体可以含有以能够工作的方式与编码本发明的抗人CTGF抗体或其重链可变区和/或轻链可变区的基因连接的启动子。作为用于在细菌中表达编码本发明的抗体或其重链可变区和/或轻链可变区的基因的启动子,在宿主为埃希氏菌属菌的情况下,可以列举例如:Trp启动子、lac启动子、recA启动子、λPL启动子、lpp启动子、tac启动子等。作为用于在酵母中表达的启动子,可以列举例如:PH05启动子、PGK启动子、GAP启动子、ADH启动子,作为用于在芽孢杆菌属菌中表达的启动子,可以列举:SL01启动子、SP02启动子、penP启动子等。另外,在宿主为哺乳动物细胞等真核细胞的情况下,可以列举:来源于SV40的启动子、逆转录病毒的启动子、热休克启动子等。

[0082] 在使用细菌、特别是大肠杆菌作为宿主细胞的情况下,本发明的表达载体可以进一步包含起始密码子、终止密码子、终止子区和可复制单元。另一方面,在使用酵母、动物细胞或昆虫细胞作为宿主的情况下,本发明的表达载体可以包含开始密码子、终止密码子。另外,该情况下,可以包含增强子序列、编码本发明的抗体或其重链可变区或轻链可变区的基因的5'侧和3'侧的非翻译区、分泌信号序列、剪接部、多聚腺苷酸化位点或可复制单元等。另外,根据目的,可以包含通常使用的选择标记(例如,四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、新霉素抗性基因、二氢叶酸还原酶基因)。

[0083] 本发明还提供导入了编码本发明的抗体或其重链可变区和/或轻链可变区的基因的转化体。这样的转化体例如可以通过使用本发明的表达载体转化宿主细胞而制作。作为用于制作转化体的宿主细胞,只要适合上述的表达载体且能够被转化,则没有特别限定,可以例示本发明的技术领域通常使用的天然细胞或人工建立的细胞等各种细胞(例如,细菌(埃希氏菌属菌、芽孢杆菌属菌)、酵母(酵母属、毕赤酵母属等)、动物细胞或昆虫细胞(例如,Sf9)等)。转化可以通过本身公知的方法进行。

[0084] 本发明的转化体优选为使用含有包含编码本发明的抗体的重链可变区的序列的多核苷酸和包含编码本发明的抗体的轻链可变区的序列的多核苷酸的表达载体转化后的宿主细胞,或者使用含有包含编码本发明的抗体的重链可变区的序列的多核苷酸的表达载体和含有包含编码本发明的抗体的轻链可变区的序列的多核苷酸的表达载体转化后的宿主细胞。本发明的转化体更优选为使用含有上述的包含编码本发明的抗体的重链的序列的多核苷酸和包含编码本发明的抗体的轻链的序列的多核苷酸的表达载体转化后宿主细胞,或者使用含有上述的包含编码本发明的抗体的重链的序列的多核苷酸的表达载体和含有包含编码本发明的抗体的轻链的序列的多核苷酸的表达载体转化后的宿主细胞。

[0085] 本发明还提供包括使编码本发明的抗体或其重链可变区和/或轻链可变区的基因在宿主细胞中表达的步骤,即,使用这种转化体的步骤的本发明的抗人CTGF抗体的生产方法。在该方法中使用的宿主细胞优选为使用上述的本发明的表达载体转化后的宿主细胞,该表达载体可以分开或同时含有包含编码本发明的抗体的重链可变区的序列的多核苷酸和包含编码本发明的抗体的轻链可变区的序列的多核苷酸。

[0086] 在本发明的抗人CTGF抗体的生产中,转化体可以在营养培养基中进行培养。营养培养基优选含有转化体的生长所需的碳源、无机氮源或有机氮源。作为碳源,可以例示例

如：葡萄糖、右旋糖酐、可溶性淀粉、蔗糖等，作为无机氮源或有机氮源，可以例示例如：铵盐类、硝酸盐类、氨基酸、玉米浸液、蛋白胨、酪蛋白、肉浸膏、大豆粕、马铃薯提取液等。另外，可以根据期望含有其他营养素（例如，无机盐（例如，氯化钙、磷酸二氢钠、氯化镁）、维生素类、抗生素（例如，四环素、新霉素、氨基青霉素、卡那霉素等）等）。

[0087] 转化体的培养可以通过本身公知的方法进行。适当选择培养条件，例如温度、培养基的pH和培养时间。例如，在宿主为动物细胞的情况下，作为培养基，可以使用含有约5～20%的胎牛血清的MEM培养基(Science, Vol.122, p.501, 1952)、DMEM培养基(Virology, Vol.8, p.396, 1959)、RPMI1640培养基(J. Am. Med. Assoc., Vol.199, p.519, 1967)、199培养基(proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.73, p.1, 1950)等。培养基的pH优选为约6～约8，培养通常在约30℃～约40℃进行约15小时～约72小时，根据需要也可以进行通气或搅拌。在宿主为昆虫细胞的情况下，可以列举例如含有胎牛血清的Grace's培养基(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985)等，其pH优选为约5～约8。培养通常在约20℃～约40℃进行15～100小时，根据需要也可以进行通气或搅拌。在宿主为细菌、放线菌、酵母、丝状菌的情况下，例如，含有上述营养源的液体培养基是适当的。优选pH为5～8的培养基。在宿主为大肠杆菌的情况下，作为优选的培养基，可以例示LB培养基、M9培养基(Miller等、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972)等。在该情况下，培养可以根据需要在通气、搅拌的同时，通常在14～43℃进行约3小时～约24小时。在宿主为芽孢杆菌属菌的情况下，可以根据需要在通气、搅拌的同时，通常在30～40℃进行约16小时～约96小时。在宿主为酵母的情况下，作为培养基，可以列举例如Burkholder基本培养基(Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980)，优选pH为5～8。培养通常在约20℃～约35℃进行约14小时～约144小时，根据需要也可以进行通气或搅拌。

[0088] 本发明的抗人CTGF抗体可以通过对上述的转化体进行培养而从该转化体中回收，优选进行分离、纯化。作为分离、纯化方法，可以列举例如：盐析、溶剂沉淀法等利用溶解度的方法、透析、超速过滤、凝胶过滤、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳等利用分子量差异的方法、离子交换色谱、羟磷灰石色谱等利用带电的方法、亲和色谱等利用特异亲和性的方法、反相高效液相色谱等利用疏水性差异的方法、等电点电泳等利用等电点差异的方法等。

[0089] 对本发明进行了全面记载，为了获得进一步的理解，在此提供参考的特定实施例，但这些实施例的目的在于例示，并不用于限定本发明。

[0090] 实施例

[0091] 对于使用市售的试剂盒或试剂等的部分，若无特别说明，则按照附属的操作说明进行实验。

[0092] (实施例1：各种来源的CTGF蛋白质的获得)

[0093] 本发明人获得了人CTGF蛋白质作为用于制作抗CTGF抗体的抗原。将人CTGF的全长基因(序列号13)整合入表达载体(pcDNA3.1; Invitrogen公司)中，将制成的载体使用作为基因导入试剂的FreeStyle MAX Reagent(Invitrogen公司)对FreeStyle293细胞(Invitrogen公司)进行基因导入。将该细胞在使用FreeStyle293表达培养基(Invitrogen公司)的无血清培养体系中培养后，获得了含有人CTGF蛋白质的培养上清。使用HiTrap肝素柱和CM柱(GE医疗日本公司)从获得的培养上清中纯化蛋白质，将其用于以下的实验。对于

小鼠、大鼠和猴CTGF蛋白质,也使用同样的方法获得。

[0094] (实施例2:对VelocImmune小鼠的免疫)

[0095] 通过对VelocImmune小鼠进行免疫,获得抗人CTGF的抗体。为了提高所得到的抗体的多样性,本发明人对多种免疫方法、给药途径、佐剂、免疫期间等进行了研究。作为免疫原,使用纯化的人CTGF,与佐剂混合后进行免疫。作为给药途径,对足底给药和腹腔内给药进行了研究。作为佐剂,对TiterMax Gold(CytRx公司)、完全弗氏佐剂(Sigma公司)和不完全弗氏佐剂(Sigma公司)进行了研究。作为进一步添加的免疫激活剂,对CpG寡核苷酸和磷酸铝凝胶(BRENNTAG公司)进行了研究。作为免疫期间,对3周~14周进行了研究。数次免疫后,从小鼠尾静脉进行采血,监测效价,由此进行产生与人CTGF结合的抗体的VelocImmune小鼠的选择。

[0096] 效价测定使用以下的标准ELISA方法进行测定。向Maxisorp384孔板(Nunc公司)中添加20 μ L人CTGF的磷酸缓冲生理盐水(PBS)溶液(1 μ g/mL),在4 $^{\circ}$ C孵育过夜进行固相化。次日,使用100 μ L清洗液(TBST:含有0.05%Tween-20的Tris缓冲液)将板清洗1次后,添加100 μ L封闭剂(含有1%BSA的PBS),在室温静置1小时。使用100 μ L TBST清洗液清洗1次后,制作采血得到的血浆的稀释系列并添加。在室温孵育1小时后,使用100 μ L TBST清洗液清洗3次,添加20 μ L使用含有0.1%BSA的TBST清洗液稀释5000倍的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG抗体(HRP-goat anti-mouse IgG antibody;Zymed公司)。在室温孵育1小时后,使用100 μ L TBST清洗液清洗3次。加入40 μ L TMB显色试剂(住友酚醛塑料株式会社),在室温静置10分钟后,加入40 μ L终止液(2mol/L硫酸)使反应停止,测定450nm的吸光度。

[0097] (实施例3:产生抗人CTGF抗体的杂交瘤的制作)

[0098] 对确认抗体效价的上升后选择出的小鼠进行最终免疫(抗原的静脉内施用或腹腔内施用)。按照常规方法,摘除免疫后的小鼠的脾脏、淋巴结等,收集淋巴细胞,将其与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合,由此制作杂交瘤。对杂交瘤进行有限稀释,在得到单一克隆的基础上,使用蛋白A或蛋白G柱(GE医疗日本公司)从上清中纯化抗体。

[0099] (实施例4:ELISA检测)

[0100] 本发明人使用ELISA方法对抗体与CTGF的结合特异性进行了评价。向Maxisorp384孔板(Nunc公司)中添加20 μ L人CTGF的PBS溶液(1 μ g/mL),在4 $^{\circ}$ C孵育过夜进行固相化。次日,使用100 μ L清洗液(TPBS:含有0.05%Tween-20的PBS)将板清洗1次后,添加100 μ L封闭剂(含有1%BSA的PBS),在室温静置1小时。使用100 μ L TBST清洗液清洗1次后,将纯化抗体样品制成适当稀释系列并添加。在室温孵育1小时后,使用100 μ L TBST清洗液清洗3次,添加20 μ L使用含有0.1%BSA的TBST清洗液稀释5000倍的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG抗体(HRP-goat anti-mouse IgG antibody;Zymed公司)。在室温孵育1小时后,使用100 μ L TBST清洗液清洗3次。加入40 μ L TMB显色试剂(住友酚醛塑料株式会社),在室温静置10分钟后,加入40 μ L终止液(2mol/L硫酸)使反应停止,测定450nm的吸光度。使用复孔对各抗体进行试验,通过曲线拟合分析EC50。

[0101] 其结果,确认命名为37-45的抗体具有高结合活性(EC50:1.6ng/ml)。

[0102] (实施例5:抗体的序列确定)

[0103] 对于鉴定出的抗体37-45,本发明人从杂交瘤中克隆了编码抗体的重链和轻链的基因。从杂交瘤中提取RNA,使用cDNA扩增试剂盒(SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒;

Clontech公司)制作cDNA。接着,使用PCR,对重链和轻链的可变区进行延伸和扩增。将PCR产物重组入pCR3.1-TOP0(Invitrogen公司)等PCR产物亚克隆用载体后,使用测序仪(ABI PRISM3100;应用生物系统公司)鉴定基因序列。

[0104] 将鉴定的37-45的重链可变区的碱基序列示于序列号1中,将氨基酸序列示于序列号2中,将37-45的轻链可变区的碱基序列示于序列号3中,将氨基酸序列示于序列号4中。

[0105] (实施例6:完全人型抗体的制作)

[0106] 上述抗体为可变区来源于人、恒定区来源于小鼠的抗体。因此,本发明人将来源于小鼠的恒定区替换成来源于人的恒定区,制作成完全人型抗体(完全人型37-45)。具体而言,在抗体的重链可变区基因的5'侧连接信号序列,然后在3'侧连接人Ig γ 1的恒定区基因(Man Sung Co等,(1992)J Immunol.Vol.148(4):1149-1154),将该重链基因插入GS载体(Lonza Biologics公司)pEE6.4中。插入时,将基因中的限制酶BbvCI识别位点改变成对抗体的氨基酸序列没有影响的DNA序列。另外,在抗体的轻链可变区基因的5'侧连接信号序列,然后在3'侧连接人 κ 链的恒定区基因(Man Sung Co等,出处同上),将该轻链基因插入GS载体pEE12.4中。

[0107] 将制成的完全人型37-45的重链的碱基序列示于序列号5中,将氨基酸序列示于序列号6中,将该抗体的轻链的碱基序列示于序列号7中,将氨基酸序列示于序列号8中。

[0108] (实施例7:可变区的糖链修饰位点的突变体制作)

[0109] 上述的完全人型37-45的重链可变区氨基酸包含N-X-(T/S)的N型糖链修饰基序序列。具体而言,序列号2所示的重链可变区中的、基于Kabat编号的58位的Asn相当于糖链修饰位点。如果存在糖链修饰位点,则在细胞培养期间产生向抗体上的糖链的添加,已知糖链的添加依赖于培养条件、表达的宿主。即,即使是已建立的同一抗体产生细胞,糖链添加的程度也可能随培养条件(培养基、细胞密度等)而改变,可能难以获得质量均匀的抗体药品。因此,本发明人制作了完全人型37-45的重链可变区导入有突变的完全人型抗体(完全人型37-45-MH1)。

[0110] 将制成的完全人型37-45-MH1的重链可变区的碱基序列示于序列号9中,将氨基酸序列示于序列号10中。将制成的完全人型37-45-MH1的重链的碱基序列示于序列号11中,将氨基酸序列示于序列号12中。完全人型37-45-MH1的轻链与完全人型37-45的轻链相同。

[0111] 完全人型37-45-MH1抗体的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3分别为基于Kabat编号的重链可变区的31~35位、50~65位和95~102位的区域,分别由序列号10的31~35位、50~66位和99~108位的氨基酸序列构成。完全人型37-45-MH1抗体的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3分别为基于Kabat编号的轻链可变区的24~34位、50~56位和89~97位的区域,分别由序列号4的24~35位、51~57位和90~98位的氨基酸序列构成。

[0112] (实施例8:完全人型抗体的表达和纯化)

[0113] 将分别插入有上述各抗体(完全人型37-45和完全人型37-45-MH1)的重链和轻链的基因的上述GS载体使用NotI和PvuI进行限制酶切割,使用Ligation-Convenience试剂盒(NIPPONGENE公司)或Ligation-high(东洋纺公司)进行连接,构建插入有重链和轻链两种基因的GS载体。该载体编码全长的重链、轻链和谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase),通过转染到CHO-K1SV细胞中使其表达抗体。使用蛋白A或蛋白G柱(GE医疗日本公司)纯化培养上清,得到各完全人型抗体的纯化抗体。

[0114] (实施例9:完全人型抗体的ELISA检测)

[0115] 本发明人使用ELISA方法对上述实施例中制作的完全人型37-45和完全人型37-45-MH1与人、小鼠、大鼠和猴CTGF的结合特异性进行了评价。在此,使用与实施例4所述的方法同样的方法,但作为二次抗体,使用以含有0.1%BSA的TBST清洗液稀释5000倍的辣根过氧化物酶标记兔抗人IgG抗体(HRP-rabbit anti-human IgG antibody;丹科公司)。使用复孔对各抗体进行试验,通过曲线拟合分析EC50。

[0116] 其结果可知,任何一种完全人型抗体对人、小鼠、大鼠和猴CTGF均具有相同程度的结合能力。

[0117] 表1:完全人型抗体对各种CTGF的结合活性

	完全人型 37-45 EC50 (ng/ml)	完全人型 37-45-MH1 EC50 (ng/ml)
人 CTGF	13.2	10.4
小鼠 CTGF	12.4	9.2
大鼠 CTGF	13.1	9.2
猴 CTGF	12.5	8.6

[0119] (实施例10:基于SPR分析的结合活性评价)

[0120] 本发明人为了更详细地测定完全人型37-45-MH1的抗原特异结合活性,进行了表面等离子共振(SPR)分析。在本实施例中,作为比较抗体,使用抗人CTGF抗体CLN1(专利文献2)。

[0121] 在SPR分析中,使用Biacore2000(GE医疗日本公司)进行分析。使用人抗体捕捉试剂盒和胺偶联试剂盒(GE医疗日本公司)将抗CTGF抗体固相化在传感器芯片CM5的表面上。将实施例1中获得的人CTGF使用HBS-EP溶液(GE医疗日本公司)进行梯度稀释,以50μl/分钟的流速添加100μl至流路中。利用该测定系统,使用数据分析软件(BIA Evaluation, BIA评估)计算人CTGF蛋白质与抗CTGF抗体的结合速率常数(k_a)、解离速率常数(k_d)和解离常数(KD)。

[0122] 表2:基于SPR分析的完全人型37-45-MH1对人CTGF的结合活性

	KD(M)	$k_d(1/s)$
完全人型37-45-MH1	3.7×10^{-11}	1.6×10^{-4}
CLN1	4.6×10^{-10}	3.7×10^{-3}

[0124] 其结果确认,完全人型37-45-MH1与抗体CLN1的活性相比对人CTGF具有高约12倍的结合活性。

[0125] (实施例11:大鼠肾来源细胞中的胶原蛋白合成的抑制作用)

[0126] 本发明人为了测定完全人型37-45-MH1的抗原特异中和活性,研究了其对大鼠成纤维细胞NRK-49F中的TGFβ诱导性胶原蛋白合成的抑制效果。在本实施例中,使用CLN1作为比较抗体。

[0127] NRK-49F细胞(由ATCC获得)通过添加TGFβ而产生CTGF。将NRK-49F细胞在含有10%FCS的DMEM培养基中接种到24孔板(5×10^4 细胞)中,24小时后,置换成含有0.01%FCS的

DMEM(500 μ L)。进而,在24小时后,向培养基中加入TGF β (R&D Systems公司;1ng/ml)。在添加TGF β 1小时前,添加抗人CTGF抗体(完全人型37-45-MH1或CLN1)(1 μ g/ml、3 μ g/ml、10 μ g/ml这3组)。72小时后,回收上清,进行SDS-PAGE,使用抗I型胶原抗体(Abcam公司),按照常规方法进行蛋白免疫印迹分析。其结果,确认完全人型37-45-MH1与CLN1浓度依赖性地相比具有更强的胶原蛋白合成抑制能力。

[0128] (实施例12:利用小鼠残余肾脏模型的肾功能评价试验)

[0129] 肾小球硬化、肾小管变性是在引起慢性肾病的各种肾损伤中共同出现的观察结果。该慢性肾病可以使用呈现进行性肾损伤的小鼠残余肾脏模型进行研究。在该模型中,通过2/3单侧肾摘除和对侧肾全部摘除(5/6肾摘除)对残余肾施加负荷,诱导显著的蛋白尿和肾功能降低,病理组织学上显示出肾小球硬化、肾小管变性,表现轻度的间质纤维化(例如,参考Kidney International、64、350-355、2003年)。

[0130] 5/6肾摘除参考Zhang等的方法(Kidney International、56、549-558、1999年)进行。对9周龄的雄性小鼠ICR(日本SLC,静冈县滨松市)腹腔内施用戊巴比妥(50mg/kg)将其麻醉,切除左肾的头侧1/3和尾侧1/3。从最初的手术起1周后,腹腔内施用戊巴比妥(50mg/kg)将其麻醉,将右侧的肾脏完全摘除,完成5/6肾摘除。

[0131] 从5/6肾摘除起1周后,进行采尿和采血,测定尿中蛋白排泄率和肾功能参数(血中肌酐浓度和肌酐清除率)。蛋白浓度测定通过Bradford法进行(伯乐实验室)。肌酐浓度使用CRE-EN KAINOS(KAINOS公司)进行测定。尿中蛋白排泄率通过将尿中蛋白浓度(mg/ml)使用尿中肌酐浓度(mg/dL)校正后算出。以这些尿中蛋白排泄率、血中肌酐浓度和肌酐清除率作为指标,分为溶剂处置组(施用pH7.4的磷酸缓冲液)或抗体施用组(1组15例)。抗体施用的用量设定为0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg这3组,开始试验。磷酸缓冲液或完全人型37-45-MH1每周1次皮下注射于背部(合计施用6次)。在试验开始时、从试验开始起第4周和第6周采取尿试样和血液试样,测定尿中蛋白排泄率、血中肌酐浓度和肌酐清除率。

[0132] 对于尿中蛋白排泄率而言,在试验开始的时刻,在溶剂处置组中,与正常组比较尿中蛋白排泄率增加(正常组 5.1 ± 0.4 ;溶剂处置组 9.7 ± 0.7 ($P < 0.01$))。在从试验开始起第4周、第6周,在溶剂处置组中,与正常组比较尿中蛋白排泄率也增加。与此相对,在抗体施用组(1mg/kg组和2mg/kg组)中,没有统计学的显著差异,与溶剂处置组比较,尿中蛋白排泄率以依赖于施用量的方式减少。

[0133] 对于血中肌酐浓度而言,在试验开始的时刻,在溶剂处置组中,与正常组比较血中肌酐浓度上升(正常组 0.36 ± 0.013 mg/dL;溶剂处置组 0.53 ± 0.016 mg/dL($P < 0.01$))。而且,在第4周、第6周,在溶剂处置组中,与正常组比较血中肌酐浓度也上升(第4周:正常组 0.42 ± 0.025 mg/dL、溶剂处置组 0.66 ± 0.037 mg/dL($P < 0.01$);第6周:正常组 0.31 ± 0.016 mg/dL、溶剂处置组 0.81 ± 0.126 mg/dL($P < 0.05$))。对于抗体处置组而言,在0.5mg/kg组中,没有显著差异,但与溶剂处置组比较,在第4周和第6周血中肌酐浓度降低。另外,在1mg/kg组和2mg/kg组中,与溶剂处置组比较,血中肌酐浓度的上升得到显著抑制(第4周:1mg/kg组 0.51 ± 0.022 mg/dL($P < 0.05$)、2mg/kg组 0.51 ± 0.015 mg/dL($P < 0.05$);第6周:1mg/kg组 0.55 ± 0.043 mg/dL($P < 0.05$)、2mg/kg组 0.49 ± 0.024 mg/dL($P < 0.01$))。

[0134] 对于肌酐清除率(尿中肌酐浓度 $\times$ 24小时的尿量/血中肌酐浓度)而言,在试验开始的时刻,在溶剂处置组中,与正常组比较确认到肌酐清除率的减少(正常组 1.8 ± 0.18 ;溶

剂处置组 1.3 ± 0.08 ($P < 0.01$)。然后,在第4周、第6周,在溶剂处置组中,与正常组比较肌酐清除率也降低(第4周:正常组 2.1 ± 0.16 、溶剂处置组 1.6 ± 0.16 ;第6周:正常组 2.8 ± 0.29 、溶剂处置组 1.4 ± 0.17 ($P < 0.001$)。对于抗体处置组而言,在 0.5 mg/kg 组中,与溶剂处置组比较,确认到肌酐清除率的降低抑制。与此相对,在 1 mg/kg 组中,在第4周和第6周,与溶剂处置组比较肌酐清除率的降低得到显著抑制(第4周:溶剂处置组 1.6 ± 0.16 、 1 mg/kg 组 2.1 ± 0.11 ($P < 0.05$);第6周:溶剂处置组 1.4 ± 0.17 、 1 mg/kg 组 2.0 ± 0.18 ($P < 0.05$)。另外,在 2 mg/kg 组中,在第6周,与溶剂处置组比较肌酐清除率的降低得到显著抑制(第6周:溶剂处置组 1.4 ± 0.17 ; 2 mg/kg 组 1.9 ± 0.14 ($P < 0.05$)。)

[0135] 由这些结果确认,完全人型37-45-MH1在慢性肾病模型中抑制了肾功能降低。

[0136] (实施例13:利用大鼠肾炎模型的药理评价试验)

[0137] 大鼠抗Thy1.1模型是通过注入针对位于肾小球的系膜细胞表面的Thy抗原的抗体而发病的、确立的系膜增生性肾小球肾炎模型(例如,参考Yamamoto和Wilson,1987Kidney Int.32:514-25;Morita等,1998Am J Kidney Dis31:559-73)。在本模型中,系膜细胞溶解后,系膜细胞的增生和细胞外基质增加,尿蛋白质上升(例如,参照Floege等,1991Kidney Int.40:477-88;Ito等,2001J Am Soc Nephrol.12:472-84)。抗Thy1.1模型与人的IgA肾病、过敏性紫癜类似,使用本模型能够以蛋白尿作为指标预测病态的进展(例如,参考Kasuga等,2001Kidney Int.60:1745-55;Liu等,2007Nephron Exp Nephrol.105:e65-74)。

[0138] 将抗Thy1.1抗体(抗大鼠CD90(Thy1.1)单克隆抗体-腹水;CEDARLANE公司)使用生理盐水制备成 0.1 g/mL ,通过对大鼠静脉内施用(每 100 g 体重 $200 \mu\text{L}$)而引起肾炎。在抗Thy1.1抗体施用4小时后,静脉内施用完全人型37-45-MH1(0.5 mg/kg 、 1 mg/kg 或 2 mg/kg)或溶剂(PBS)。从病态诱发起3至4天后,进行24小时采尿,测定尿中蛋白质的24小时的排泄量(UP)和尿中蛋白排泄率(UP/uCr:将尿中蛋白浓度(mg/mL)用尿中肌酐浓度(mg/dL)进行校正)。将其结果示于表3(UP)和表4(UP/uCr)中。

[0139] 表3

[0140] UP

[0141]

	UP (mg/天)	相对于溶剂施用组的 抑制率 (%)	p值
正常动物组	1.9	100.0	
溶剂施用组(PBS)	114.3	0.0	$p < 0.001$ #
完全人型 37-45-MH1 0.5 mg/kg	115.2	-0.8	
完全人型 37-45-MH1 1 mg/kg	95.5	16.8	
完全人型 37-45-MH1 2 mg/kg	83.8	27.2	$p = 0.029$ *

[0142] #:与正常动物组的比较检验(t检验)

[0143] *:与溶剂施用组的比较检验(Dunnett检验)

[0144] 表4

[0145] UP/uCr

	UP/uCr (mg/mg)	相对于溶剂施用组的 抑制率 (%)	p值
正常动物组	0.315	100.0	
溶剂施用组 (PBS)	32.855	0.0	p<0.001 #
完全人型 37-45-MH1 0.5 mg/kg	26.280	22.6	
完全人型 37-45-MH1 1 mg/kg	22.427	33.9	p=0.037 *
完全人型 37-45-MH1 2 mg/kg	18.427	46.0	p=0.0039 *

[0147] #:与正常动物组的比较检验(t检验)

[0148] *:与溶剂施用组的比较检验(Dunnett检验)

[0149] 其结果,完全人型37-45-MH1用量依赖性地抑制蛋白尿,在2mg/kg组中,相对于溶剂施用组的抑制率以UP作为指标时为27.2%,UP/uCr为46.0%。

[0150] 接着,为了确认与CLN1的作用强度的差异,进行相同模型评价。评价步骤与上述相同。评价以上述中有效的用量作为参考,将2mg/kg的完全人型37-45-MH1作为阳性对照,使用2mg/kg的CLN1和10倍用量即20mg/kg的CLN1。另外,为了考察异种抗体处置所引起的非特异性免疫反应的参与,以2mg/kg和20mg/kg的人型IgG1抗体(抗KLH(匙孔血蓝蛋白)抗体:将KLH对VelocImmune小鼠进行免疫,获得抗体。然后,与完全人型37-45-MH1同样地以完全人型IgG1的形式制作)作为对照。将其结果示于表5(UP)和表6(UP/uCr)中。

[0151] 表5

[0152] UP

	UP (mg/天)	相对于溶剂施用 组的抑制率 (%)	p值	相对于IgG施用 组的抑制率 (%)	p值
正常动物组	0.8	100.0		100.0	
溶剂施用组 (PBS)	111.1	0.0	p<0.001 #		
对照 IgG 2 mg/kg	114.5	-3.1		0.0	p<0.001 #
对照 IgG 20 mg/kg	113.4	-2.1		0.0	p<0.001 #
CLN1 2 mg/kg	97.2	12.6	p=0.45 *	15.2	p=0.22 &
CLN1 20 mg/kg	107.3	3.5	p=0.79 *	5.4	p=0.53 \$
完全人型 37-45-MH1 2 mg/kg	78.0	29.1	p=0.044 *	31.2	p=0.0011 &

[0154] #:与正常动物组的比较检验(t检验)

[0155] *:与溶剂施用组的比较检验(t检验)

[0156] &:与对照IgG 2mg/kg组的比较检验(t检验)

[0157] \$:与对照IgG 20mg/kg组的比较检验(t检验)

[0158] 表6

[0159] UP/uCr

[0160]

	UP/uCr (mg/mg)	相对于溶剂施用 组的抑制率(%)	p值	相对于IgG施用 组的抑制率(%)	p值
正常动物组	0.3	100.0		100.0	
溶剂施用组(PBS)	46.1	0.0	p<0.001 #		
对照 IgG 2 mg/kg	52.2	~13.4		0.0	p<0.001 #
对照 IgG 20 mg/kg	42.7	7.5		0.0	p<0.001 #
CLN1 2 mg/kg	36.3	21.5	p=0.18 *	30.8	p<0.030 &
CLN1 20 mg/kg	41.9	9.5	p<0.49 *	2.2	p<0.82 \$
完全人型 37-45-MH1 2 mg/kg	28.1	39.2	p<0.0092 *	46.4	p<0.001 &

[0161] #:与正常动物组的比较检验(t检验)

[0162] *:与溶剂施用组的比较检验(t检验)

[0163] &:与对照IgG 2mg/kg组的比较检验(t检验)

[0164] \$:与对照IgG 20mg/kg组的比较检验(t检验)

[0165] 其结果,病态的发病程度与上一次基本同样。而且,2mg/kg的完全人型37-45-MH1显示出与上一次评价基本相同的抑制率,在以溶剂施用组作为对照的情况下,抑制率以UP为指标时在2mg/kg时为29.1%,UP/uCr为39.2%。

[0166] 另一方面,CLN1与完全人型37-45-MH1比较,蛋白尿抑制作用弱(2mg/kg时,在以UP和UP/uCr作为指标的情况下,相对于溶剂施用组的抑制率分别为12.6%和21.5%;在20mg/kg时,在以UP和UP/uCr作为指标的情况下,相对于溶剂施用组的抑制率分别为3.5%和9.5%)。另外,人型IgG1抗体对蛋白尿几乎没有影响。

[0167] 由此确认,完全人型37-45-MH1与CLN1比较,具有更强的蛋白尿抑制作用。

[0168] 产业上的可利用性

[0169] 本发明的抗人CTGF抗体对于以慢性肾病、糖尿病性肾病等肾脏疾病为代表的、人CTGF参与病态形成的各种疾病的预防或治疗有用。

序列表

<110> 安斯泰来制药株式会社 (Astellas Pharma Inc.)
 <120> 新型抗人 CTGF 抗体 (Novel anti-human CTGF antibody)
 <130> A12037A00
 <150> JP2011-281811
 <151> 2011-12-22
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH gene of anti-human CTGF antibody
 [0001]
 <400> 1
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tectgcaagg ctcttgata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 tcacagaagt ttcagggcag ggtaaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggetgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt 300
 aagtggaaact acccttttga ctactggggc cagggaaacc tggtaaccgt ctectca 357
 <210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH of anti-human CTGF antibody

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0002]

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Lys Trp Asn Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL gene of anti-human CTGF antibody

<400> 3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gaagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gattcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgtagtgt tttctgtcag cagtatgtca gcacaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacgg 327

<210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL of anti-human CTGF antibody

[0003]

<400> 4
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Val Ser Thr Pro

	85	90	95
	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	100	105	
<210>	5		
<211>	1350		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	H-chain gene of anti-human CTGF antibody		
<400>	5		
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc		60
	tectgcaagg ctcttgata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc		120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggatg cacaaactat		180
[0004]	tcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgteccatcag cacagcctac		240
	atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt		300
	aagtggaaact acccttttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagcc		360
	tecaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc		420
	acagcggccc tgggtgcct ggtaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcgtg		480
	aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga		540
	ctctactccc ttagtagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac		600
	atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa		660
	tcttgtagaca aaactcacac atgcccaccg tgcaccagc ctgaactcct ggggggaccg		720
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacccctgag		780
	gtcacatgag tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac		840

```

gtggacggcg tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtetecaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tetatcccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactecgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggiggcag     1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag     1320
aagagectct cctgtctcc gggtaaataa                                     1350

```

[0005]

```

<210> 6
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> H-chain of anti-human CTGF antibody

<400> 6

```

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15

```

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
                20              25              30

```

```

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
                35              40              45

```

```

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe
                50              55              60

```

	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Gly	Ser	Lys	Trp	Asn	Tyr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
					100					105					110	
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115					120						125		
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135					140				
[0006]	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185						190	
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

[0007] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 7

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L-chain gene of anti-human CTGF antibody

[0008]

<400> 7

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgttage agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gaagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgtagtgt tttctgtcag cagtatgtca gcacaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggttgaaat caaacggact gtggetgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggectgagct cgeccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L-chain of anti-human CTGF antibody

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

[0009]

Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Val Ser Thr Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130	135	140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
145	150	155
		160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
165	170	175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
180	185	190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
195	200	205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

[0010]

<210> 9

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH gene of anti-human CTGF antibody

<400> 9

caggtgcagc tggcgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggccctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgata cacctteacc ggctactata tgtattgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180

gccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggetgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagaggaggt 300

aagtggaaact acccttttga ctactggggc cagggaaccc tggcaccgt ctctca 357

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> VH of anti-human CTGF antibody

 <400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

[0011]

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Lys Trp Asn Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11

<211>	1350	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	H-chain of anti-human CTGF antibody	
<400>	11	
	caggtgcage tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcttgcgaagg ctctctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat	180
	gcccagaagt ttccagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt	300
	aagtggaaact acccttttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc	360
	tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
[0012]	acagcggccc tgggctgcct ggteaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
	aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	540
	ctctactccc ttagtagcgt ggtagccgig ccttcagca gtttgggcac ccagacctac	600
	atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660
	tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactect ggggggaccg	720
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccttgag	780
	gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	840
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggtgaa tggcaaggag	960
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tegagaaaac catctccaaa	1020
	gcccgaaggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgtg 1200
 gactccgaag gctccttctt cctetacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> H-chain of anti-human CTGF antibody

<400> 12

[0013] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala	Arg	Gly	Ser	Lys	Trp	Asn	Tyr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100				105						110	

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115						120					125		

Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135						140		

Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160

Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	

[0014]	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185						190	

Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			

Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220			

Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240

Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245					250						255	

Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265						270	

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

[0015]

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 13

<211> 1050

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgaccgcgc ccagtatggg ccccgccgc gtcgccttcg tggctctcct cgcctctgc 60

agccggccgg ccgicggcca gaacigcagc gggccgigcc ggtgcccgga cgagccggcg 120

ccgcgtgcc cggcgggcgt gagcctcgtg ctggacggct gcggtcgtg ccgcgtctgc 180

gccaaacagc tgggcgagct gtgcaccgag cgcgaccctt gcgaccgca caagggcctc 240

ttctgtgact tcggctcccc ggccaaccgc aagatcggcg tgtgcaccgc caaagatggt 300

gtcctctgca tcttcgggtg tacgggtgac cgcagcggag agtccttcca gacagctgc 360

[0016]

aagtaccagt gcacgtgcct ggacggggcg gtgggctgca tgccctgtg cagcatggac 420

gttcgtctgc ccagccctga ctgcccttc ccgaggaggg tcaagctgcc cgggaaatgc 480

tgcgaggagt ggggtgtgtg cgagcccaag gaccaaaccg tggttgggcc tgccctcgcg 540

gcttaccgac tggaagacac gtttgcccca gacccaacta tgattagagc caactgcctg 600

gtccagacca cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcac ctccaccgg 660

gttaccaatg acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg 720

ccttgcaag ctgacctgga agagaacatt aagaaggca aaaagtgcac ccgtactccc 780

aaaatctcca agcctatcaa gtttgagctt tctggctgca ccagcatgaa gacataccga 840

gctaaattct gtggagtatg taccgacggc cgatgctgca cccccacag aaccaccacc 900

ctgccgggtg agttcaagt ccctgacggc gaggtcatga agaagaacat gatgttcac 960

aagacctgtg cctgccatta caactgtccc ggagacaatg acatctttga atcgtgttac 1020

tacaggaaga tgtacggaga catggcatga

1050

<210> 14

<211> 349

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val Val Leu
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro
20 25 30

Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser
35 40 45

[0017]

Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu
50 55 60

Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
65 70 75 80

Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
85 90 95

Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser
100 105 110

Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
115 120 125

Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro

130	135	140
Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys		
145	150	155 160
Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val Gly		
165	170	175
Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro		
180	185	190
Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala		
195	200	205
Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp		
210	215	220
[0018]		
Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg		
225	230	235 240
Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys		
245	250	255
Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly		
260	265	270
Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr		
275	280	285
Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu		
290	295	300
Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile		

	305	310	315	320
	Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe			
[0019]	325	330	335	
	Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala			
	340	345		