

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 029290

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2018.03.30**

(21) Номер заявки  
**201491240**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.12.21**

(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)

---

### (54) НОВОЕ АНТИЕЛО ПРОТИВ CTGF ЧЕЛОВЕКА

---

(31) 2011-281811

(56) JP-A-2007525194

(32) 2011.12.22

WO-A1-2007066823

(33) JP

WO-A1-1999033878

(43) 2014.11.28

JP-A-2004524841

(86) PCT/JP2012/083206

JP-A-2002532082

(87) WO 2013/094723 2013.06.27

WO-A1-2010053751

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК. (JP)

(72) Изобретатель:

Ивасаки Содзи, Мория Риуити,  
Йосино Масаясу, Такакура Кодзи (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Проблема. Целью настоящего изобретения является предоставление антитела против CTGF человека, обладающего превосходной связывающей активностью и/или нейтрализующей активностью по сравнению с обычными антителами против CTGF человека, а также способа профилактики или лечения различных заболеваний, в патогенез которых вовлечен CTGF человека, включая заболевания почек, такие как хроническая почечная недостаточность и диабетическая нефропатия, с использованием антитела против CTGF человека. Способы решения проблемы. Антитело против CTGF человека содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

B1

029290

029290  
B1

### Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к новому антителу против CTGF человека. В частности, новое антитело против CTGF человека по настоящему изобретению представляет собой антитело против CTGF человека, обладающее превосходной связывающей активностью и/или нейтрализующей активностью по сравнению с обычными антителами против CTGF человека.

### Уровень техники изобретения

CTGF (фактор роста соединительной ткани) представляет собой секретируемый белок, богатый остатками цистеина, с молекулярной массой от примерно 36 до 38 кДа, принадлежащий к семейству CCN (непатентный документ 1); он, как известно, индуцируется TGF- $\beta$ , который может считаться наиболее важным фактором роста при фиброзе (непатентный документ 2). Вследствие этого предполагается, что TGF- $\beta$  индуцирует CTGF, а индуцированный CTGF стимулирует фиброз органов или тканей, и считается, что CTGF играет важную роль в фиброзе, клеточной пролиферации, метаболизме внеклеточного матрикса, ангиогенезе, артериосклерозе и тому подобном (непатентный документ 3).

Стало известно, что в CTGF имеется множество доменов, которые взаимодействуют с другими факторами. Известно, в числе прочего, что CTGF связан непосредственно с TGF- $\beta$  или BMP4 через домен C Виллебранда и вызывает стимуляцию сигнализации TGF- $\beta$  или ингибирование сигнализации BMP (непатентный документ 4).

Стало известно, что экспрессия CTGF повышена при различных заболеваниях почек (например, хронической почечной недостаточности, диабетической нефропатии, гломерулосклерозе, IgA-нефропатии, фокальном сегментарном гломерулосклерозе, ANCA-связанном нефрите, остром прогрессирующем гломерулонефрите, хронической нефропатии трансплантата, нефротическом синдроме, волчаночном нефрите и мембранопролиферативном гломерулонефрите) (непатентный документ 5), и сообщалось, что CTGF играет активную роль в фиброзе (непатентный документ 6).

Кроме того, сообщалось, что CTGF вовлечен в фиброз различных типов (склеродермию, интерстициальное заболевание легких, фиброзные заболевания легких, такие как идиопатический пульмональный фиброз, фиброз, вызываемый хроническим гепатитом B или C, радиационный фиброз, фиброз, вызываемый заживлением ран, а также гипертрофию и фиброз сердца), сосудистые пролиферативные заболевания, диабетическую ретинопатию, злокачественные новообразования и тому подобное, и таким образом, предположительно CTGF может быть новой терапевтической мишенью (непатентные документы 7 и 8).

Вследствие этого, если возможно разработать моноклональное антитело, которое специфически связывается с CTGF и обладает способностью ингибировать различные активности CTGF, такое моноклональные антитело, как ожидается, будет полезным для диагностики, профилактики или лечения различных заболеваний, в патогенез которых вовлечен CTGF.

В качестве антитела, проявляющего ингибирующее действие в отношении CTGF человека, из тех, которые были изучены до настоящего времени, сообщалось о человеческих моноклональных антителах M84 и M320 (патентный документ 1), CLN1 (патентный документ 2), мышном моноклональном антителе CTGF-m2-1 (патентный документ 3) и тому подобных. Среди них, антитело CLN1 было исследовано наиболее подробно, и его эффект был установлен на модели интерстициального пульмонального фиброза или модели почечного интерстициального фиброза с односторонней перевязкой мочеточника. CLN1 проходит клинические испытания (фаза II) под обозначением FG-3019.

Однако нельзя сказать, что обычные антитела обладают достаточной связывающей активностью для CTGF и обладают достаточно сильной нейтрализующей активностью в отношении CTGF с точки зрения терапевтической эффективности.

Как правило, примеры основных факторов, определяющих эффективные дозы фармацевтических препаратов на основе антител, включают связывающую активность или нейтрализующую активность, которую антитело имеет в отношении антигена, и количество антигена, присутствующего в организме. Однако можно сказать, что повышение связывающей активности или нейтрализующей активности непосредственно приводит к снижению дозы, и, в результате, это является очень полезным усовершенствованием, приводящим к снижению финансового бремени пациента или медицинских расходов.

По этим причинам важно иметь антитело против CTGF человека, обладающее более сильной связывающей активностью или нейтрализующей активностью, чем обычные антитела, для использования в профилактике или лечении различных заболеваний, в патогенез которых вовлечен CTGF.

### Материалы, использованные при экспертизе заявки

Патентные документы.

Патентный документ 1. JP-A-2000-232884.

Патентный документ 2. WO 2004/108764.

Патентный документ 3. WO 2007/066823.

Непатентные документы.

Непатентный документ 1. Bradham D.M. et al., J. Cell. Biol. 114: 1285-1294 (1991).

Непатентный документ 2. Igarashi A. et al., Mol. Biol. Cell. 4: 637-645 (1993).

Непатентный документ 3. Blom I.E. et al., Matrix Biol. 21 (6): 473-82 (2002).

Непатентный документ 4. Abreu, et al., Nat. Cell. Biol. 4, 599-604 (2002).

Непатентный документ 5. Ito Y. et al., Kidney Int. 53(4) 853-61 (1998).

Непатентный документ 6. Phanish M.K. et al., Nephron Exp Nephrol. 114(3) e83-92 (2010).

Непатентный документ 7. Shi-Wen X. et al., Cytokine Growth Factor Rev. 19(2): 133-44 (2008).

Непатентный документ 8. Jun J.I. et al., Nat Rev Drug Discov. 10(12): 945-63 (2011).

### **Описание изобретения**

Проблема, решаемая с помощью изобретения.

Целью настоящего изобретения является предоставление антител против CTGF человека, обладающих превосходной связывающей активностью и/или нейтрализующей активностью по сравнению с обычными антителами против CTGF человека.

Способы решения проблемы.

Настоящее изобретение включает следующие патентоспособные вещества и способы, имеющие медицинское и промышленное применение.

1. Антитело против CTGF человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

2. Антитело против CTGF человека по п.1, в котором константная область тяжелой цепи антитела представляет собой константную область Igγ1 человека.

3. Антитело против CTGF человека по п.1, в котором константная область легкой цепи антитела представляет собой константную область Igκ человека.

4. Антитело против CTGF человека по п.1, в котором константная область тяжелой цепи антитела представляет собой константную область Igγ1 человека и константная область легкой цепи антитела представляет собой константную область Igκ человека.

5. Антитело против CTGF человека по п.1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12; и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

6. Полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-5.

7. Полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-5.

8. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.6 и/или 7.

9. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.8.

10. Клетка-хозяин по п.9, которая выбрана из группы, состоящей из следующих (а) и (б):

(а) клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-5, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи данного антитела; и

(б) клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-5, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи данного антитела.

11. Способ получения антитела против CTGF человека по любому из пп.1-5, включающий экспрессирование антитела против CTGF человека путем культивирования клетки-хозяина по п.9 или 10.

12. Лекарственное средство для лечения заболевания, в патогенез которого вовлечен CTGF человека, содержащее антитело по любому из пп.1-5.

13. Лекарственное средство по п.12, при этом заболевание представляет собой заболевание почек.

14. Лекарственное средство по п.13, при этом заболевание почек представляет собой хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию.

15. Способ профилактики или лечения заболевания, в патогенез которого вовлечен CTGF человека, включающий введение антитела по любому из пп.1-5.

16. Способ по п.15, при этом заболевание представляет собой заболевание почек.

17. Способ по п.16, при этом заболевание почек представляет собой хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию.

18. Антитело по любому из пп.1-5 для применения в профилактике или лечении заболевания, в патогенез которого вовлечен CTGF человека.

19. Антитело по п.18, при этом заболевание представляет собой заболевание почек.

20. Антитело по п.19, при этом заболевание почек представляет собой хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию.

### **Эффекты изобретения**

Настоящее изобретение относится к антителам против CTGF человека, обладающим превосходной связывающей активностью и/или нейтрализующей активностью по сравнению с обычными антителами

против CTGF человека. Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению обладает мощным антифиброзным действием за счет ингибиции функции CTGF человека и применимо для профилактики или лечения различных заболеваний, в патогенез которых вовлечен CTGF человека. Кроме того, антитело против CTGF человека по настоящему изобретению обеспечивает значительные преимущества при клиническом применении, такие как уменьшение дозировки, увеличение интервала между введениями, упрощение способа введения (например, подкожная инъекция) и тому подобное, и таким образом, вносит значительный вклад в повышение эффективности лечения и в соблюдение пациентами режима лечения.

#### **Варианты осуществления изобретения**

Далее в данном документе настоящее изобретение будет описано подробно.

Авторы настоящего изобретения провели обширные исследования по получению антител против CTGF человека, и в результате им удалось получить антитела против CTGF человека, обладающие улучшенной связывающей активностью и превосходной нейтрализующей активностью по сравнению с обычными антителами против CTGF человека.

Основная структура молекулы антитела является общей для всех классов антител, и она сконфигурирована из тяжелой цепи с молекулярной массой от 50000 до 70000 и легкой цепи с молекулярной массой от 20000 до 30000. Тяжелая цепь, как правило, состоит из полипептидной цепи, содержащей примерно 440 аминокислот. Тяжелые цепи имеют структуры, характерные для различных классов, и носят названия  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$  цепи, соответственно, для IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Более того, IgG существуют в виде IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и соответствующие цепи называются  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  и  $\gamma_4$  соответственно. Легкая цепь, как правило, состоит из полипептидной цепи, содержащей примерно 220 аминокислот, для которой известно два типа, тип L и тип K, и они называются  $\lambda$  и  $\kappa$  цепи соответственно. Что касается пептидной конфигурации основной структуры молекулы антитела, две гомологичные тяжелые цепи и две гомологичные легкие цепи связаны дисульфидными связями (S-S связями) и нековалентными связями, и молекулярная масса составляет от 150000 до 190000. Два вида легких цепей способны образовывать пары с любой тяжелой цепью. Каждая молекула антитела всегда состоит из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей.

Существует четыре внутрицепочечных S-S связи в тяжелой цепи (пять связей для  $\mu$  и  $\epsilon$  цепей) и две в легкой цепи; одна петля образуется на 100-110 аминокислотных остатков, эта пространственная структура  $\gamma$  петель является схожей и называется структурной единицей или доменом. Как для тяжелых цепей, так и для легких цепей, аминокислотная последовательность домена, расположенного на их N-конце, не является постоянной, даже в эталонном стандарте из того же класса (подкласса) у одних и тех же видов животных, и этот домен называется вариабельной областью. Каждый из доменов называется вариабельной областью тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельной областью легкой цепи ( $V_L$ ) соответственно. Аминокислотная последовательность на C-концевой стороне цепей является почти постоянной в каждом классе или подклассе и называется константной областью (каждый из доменов называется  $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$  и  $C_L$  соответственно).

Сайт антигенных детерминант антитела образован  $V_H$  и  $V_L$ , и специфичность связывания зависит от аминокислотной последовательности данного сайта. С другой стороны, виды биологической активности, такие как связывание с комплементом или различными клетками, отражают различия в структуре константной области между различными классами Ig.

Вариабельность в вариабельных областях легкой цепи и тяжелых цепей главным образом ограничена тремя небольшими гипервариабельными областями, существующими в обеих цепях, и эти области называются определяющими комплементарность областями (CDR; CDR1, CDR2 и CDR3, начиная с N-концевой стороны). Остальная часть вариабельной области называется каркасной областью (FR) и является относительно постоянной.

Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению, которое авторам настоящего изобретения удалось получить, представляет собой антитело против CTGF человека, обладающее следующими характеристиками.

Антитело против CTGF человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В частности, авторы настоящего изобретения сконструировали антитела с использованием способов получения человеческих моноклональных антител при помощи мышей "VelocImmune" [VelocImmune antibody technology; Regeneron Inc. (патент США № 6596541)] и провели скрининг антител с использованием тестов для различных видов биологической активности и физических свойств, таким способом им удалось идентифицировать антитело против CTGF человека по настоящему изобретению. В способе VelocImmune трансгенных мышей, у которых эндогенные вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулинов заменены соответствующими человеческими вариабельными областями, иммунизируют интересующим антигеном (например, CTGF человека), и лимфатические клетки извлекают из мышей, производящих антитела. Проводят слияние лимфатических клеток с клетками миеломы мыши

для получения гибридом. Клетки гибридом подвергают скринингу для обнаружения клеток гибридом, продуцирующих такие антитела, которые специфически связываются с интересующим антигеном. Полученные таким образом антитела представляют собой антитела, имеющие вариабельные области антител человека и константные области антител мыши (их также называют химерными антителами). Затем, если антитело, которое специфически связывается с интересующим антигеном, идентифицировано, ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела, выделяют из клеток гибридом и связывают с ДНК, кодирующими константные области тяжелой цепи и легкой цепи желаемого класса антитела человека соответственно. Полученный ген, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела, экспрессируют в клетках (например, клетках СНО) для получения молекул антитела. Тяжелая цепь и легкая цепь антитела, полученного вышеуказанным способом, представляют собой тяжелую цепь и легкую цепь "полностью человеческого" антитела, происходящего из гена иммуноглобулина человека.

Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению может быть легко получено специалистом в данной области на основании информации о последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, раскрытой в настоящем описании, с использованием способов, известных в данной области. Предпочтительно антитело против CTGF человека по настоящему изобретению можно получать в виде полностью человеческого антитела путем соединения вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи антитела человека соответственно. В частности, получают фрагмент гена вариабельной области тяжелой цепи, имеющий последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 10) антитела по настоящему изобретению, и фрагмент гена вариабельной области легкой цепи, имеющий последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 4) антитела по настоящему изобретению. Далее эти гены вариабельных областей соединяют с генами константных областей соответствующего класса антитела человека для получения гена полностью человеческого антитела. Затем ген данного антитела связывают с соответствующим вектором экспрессии и вводят в культивируемые клетки. И, наконец, культивируемые клетки культивируют, и из культурального супернатанта можно получать моноклональное антитело.

Генные фрагменты, кодирующие аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела по настоящему изобретению, можно синтезировать с использованием метода генного синтеза, известного в данной области, на базе, например, последовательностей оснований, разработанных на основе аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи. В качестве такого метода генного синтеза можно использовать различные методы, известные специалистам в данной области, например метод синтеза генов антител, описанный в WO 90/07861.

Затем вышеописанные фрагменты генов вариабельных областей соединяют с генами константных областей антитела человека для получения гена полностью человеческого антитела. Хотя любой подкласс константной области (например, константную область тяжелой цепи, такой как  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  или  $\gamma 4$  цепь, и константную область легкой цепи, такой как  $\lambda$  или  $k$  цепь) можно выбирать в качестве используемой константной области антитела человека, предпочтительно можно использовать Ig $\gamma 1$  человека в качестве константной области тяжелой цепи и Ig $k$  человека в качестве константной области легкой цепи.

После получения этого гена полностью человеческого антитела введение гена антитела в вектор экспрессии, введение вектора экспрессии в культивируемые клетки, культивирование культивируемых клеток, очистку антитела и тому подобное можно осуществлять при помощи различных способов, известных в данной области.

Вектор экспрессии, связанный с геном антитела, полученного указанным образом, включает GS вектор pEE6.4 или pEE12.4 (Lonza Biologics), но не имеет конкретных ограничений при условии, что он способен экспрессировать такой ген антитела. Кроме того, можно использовать вектор экспрессии, уже содержащий ген константной области Ig человека, такой как AG- $\gamma 1$  или AG- $k$  (например, см. WO 94/20632).

Вышеописанный вектор экспрессии вводят в культивируемые клетки с помощью, например, метода с фосфатом кальция или метода электропорации и тому подобных методов.

В качестве культивируемых клеток, в которые вводят вектор экспрессии, можно использовать культивируемые клетки, такие как клетки СНО-K1SV, клетки СНО-DG44 и клетки 293, и эти клетки можно культивировать общепринятым способом.

После вышеописанного культивирования антитело, накопившееся в культуральном супернатанте, можно очищать различными методами колоночной хроматографии, например различными хроматографическими методами с использованием колонки с протеином A или протеином G.

Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению представляет собой антитело, которое связывается с CTGF человека. Примеры метода измерения связывающей активности полученного антитела против CTGF человека с CTGF человека включают метод ELISA и аналитический метод поверхности плазмонного резонанса (ППР) (SPR). Например, при использовании метода ELISA, CTGF

человека (SEQ ID NO: 14) иммобилизуют на планшете для ELISA, туда же добавляют антитело против CTGF человека и оставляют для проведения реакции между ними. Затем полученному продукту реакции дают возможность реагировать со вторичным антителом, таким как анти-IgG антитело, меченное ферментом, таким как пероксидаза хрена (HRP), и промывают. Затем измеряют поглощение, добавляя хромогенный субстрат (например, хромогенный реагент TMB в случае мечения HRP). Кроме того, можно измерять связывающую активность в отношении CTGF человека более детально с использованием анализа ППР. При проведении анализа ППР, например, можно использовать систему Biacore для измерения константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) между антителом против CTGF человека и CTGF человека и, таким образом, можно рассчитывать константу диссоциации ( $K_D$ ) из отношения двух констант. Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению также включает антитело, которое также связывает CTGF от других животных (например, CTGF мыши), и можно измерять его связывающую активность в отношении данного белка.

Кроме того, антитело против CTGF человека по настоящему изобретению обладает нейтрализующей активностью в отношении CTGF человека. Используемый в настоящем описании термин "нейтрализующая активность" антитела означает способность ингибировать любую биологическую активность, проявляемую CTGF, в результате связывания с CTGF, и она может быть оценена применительно к одному или более видам биологической активности CTGF в виде индекса. Примеры такой нейтрализующей активности включают ингибирующее действие на синтез коллагена в фибробластах, полученных из почки (ингибирование фиброза), и нейтрализующую активность можно оценивать с использованием метода, описанного в примерах ниже.

Для более подробной оценки эффектов антитела против CTGF человека по настоящему изобретению можно также использовать тест *in vivo* на эффективность антитела. Например, эффективность антитела *in vivo* можно оценивать, оценивая функцию почек в мышиной модели хронической почечной недостаточности или в крысиной модели нефрита, как описано в примерах ниже.

Кроме того, методы оценки различных типов стабильности (например, термостабильности, стабильности при длительном хранении и стабильности при высоких концентрациях) антитела против CTGF человека по настоящему изобретению включают метод дифференциальной сканирующей калориметрии и метод, позволяющий измерять образование агрегатов в процессе хранения.

Предпочтительно антитело против CTGF человека по настоящему изобретению можно легко получать путем синтеза ДНК, содержащей последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, и ДНК, содержащей последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4, и связывания этих ДНК с генами константных областей соответствующего класса антитела человека, предпочтительно геном константной области Ig $\gamma$ 1 человека для тяжелой цепи и геном константной области Ig $\kappa$  человека для легкой цепи, так, чтобы сконструировать ген полностью человеческого антитела с помощью методов, известных в данной области, и введения гена полностью человеческого антитела в вектор экспрессии, введения вектора экспрессии в культивируемую клетку, культивирования культивируемой клетки и очистки антитела из полученной культуры при помощи различных методов, известных в данной области. Предпочтительно ДНК, содержащая последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, содержит последовательность оснований SEQ ID NO: 9. Предпочтительно ДНК, содержащая последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4, содержит последовательность оснований SEQ ID NO: 3.

Предпочтительной тяжелой цепью антитела против CTGF человека по настоящему изобретению, содержащей вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, и константную область Ig $\gamma$ 1 человека, является тяжелая цепь, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12. Предпочтительной легкой цепью антитела против CTGF человека по настоящему изобретению, содержащей вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 4, и константную область Ig $\kappa$  человека, является легкая цепь, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. Предпочтительно ДНК, содержащая последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против CTGF человека, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, содержит последовательность оснований SEQ ID NO: 11. Предпочтительно ДНК, содержащая последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против CTGF человека, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит последовательность оснований SEQ ID NO: 7. Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению, которое содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, включает полностью человеческое антитело 37-45-MH1, описанное в примерах ниже.

Настоящее изобретение также включает антитело против CTGF человека, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 67-90 в SEQ ID NO: 10.

жениях 99-108 в SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 24-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 51-57 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 90-98 в SEQ ID NO: 4. Антитело против CTGF человека может быть также получено специалистами в данной области такими методами, как те, которые описаны выше.

Настоящее изобретение также включает фрагменты антитела против CTGF человека, такие как фрагмент одноцепочечной вариабельной области (scFv), Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела по настоящему изобретению и сохраняют активность антитела. Любой специалист в данной области на основе настоящего изобретения может сконструировать слитое антитело из антитела или фрагмента антитела против CTGF человека и другого пептида или белка и может также сконструировать модифицированное антитело, с которым связано модифицирующее средство. Другой пептид или белок, используемый для слияния, не имеет конкретных ограничений при условии, что он не снижает связывающую активность антитела; их примеры включают сывороточный альбумин человека, различные маркерные пептиды, пептид с искусственным спиральным мотивом, связывающие мальтозу белки, глутатион-S-трансферазу, различные токсины, другие пептиды или белки, способные стимулировать мультимеризацию, и тому подобное. Модифицирующее средство, используемое для модификации, не имеет конкретных ограничений при условии, что оно не снижает связывающую активность антитела; их примеры включают полиэтиленгликоль, сахарные цепи, фосфолипиды, липосомы, низкомолекулярные соединения и тому подобное.

Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению, полученное таким образом, можно дополнитель но очищать по мере необходимости, а затем его можно формулировать обычным способом, и таким образом, его можно использовать для профилактики или лечения заболеваний, в патогенез которых вовлечен CTGF, например заболеваний почек, таких как хроническая почечная недостаточность и диабетическая нефропатия, сосудистых пролиферативных заболеваний, кардиомиопатии, фибропластического заболевания печени, пульмонального фиброза, фиброзного заболевания кожи, диабетической ретинопатии и злокачественного новообразования.

Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению предпочтительно можно использовать в качестве лекарственного средства при заболеваниях почек и более предпочтительно лекарственного средства при хронической почечной недостаточности или диабетической нефропатии. Примеры препаратов для этих или тому подобных лекарственных средств включают парентеральные средства, такие как инъекционное средство и инфузионное средство, и их предпочтительно вводить внутривенным введением, под кожным введением или тому подобными способами. Кроме того, для препарата в фармацевтически приемлемом диапазоне можно использовать носитель или добавку, соответствующие этим препаратам.

Количество антитела против CTGF человека по настоящему изобретению, добавленное в вышеописанный препарат, варьируется в зависимости от тяжести симптомов и возраста пациента, лекарственной формы используемого препарата или титра связывания антитела и тому подобного; например можно использовать от примерно 0,001 до 100 мг/кг антитела.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, содержащему последовательность, кодирующую антитело против CTGF человека по настоящему изобретению, и к содержащему его вектору экспрессии. Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, содержащему последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против CTGF человека по настоящему изобретению, и полинуклеотиду, содержащему последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против CTGF человека по настоящему изобретению, а также к вектору экспрессии, содержащему любой или оба из них. Вектор экспрессии по настоящему изобретению не имеет конкретных ограничений при условии, что он способен экспрессировать ген, кодирующий антитело по настоящему изобретению или его вариабельную область тяжелой цепи, и/или вариабельную область легкой цепи в различных клетках-хозяевах из прокариотических клеток и/или эукариотических клеток, и продуцировать эти полипептиды. Примеры векторов включают плазмидные векторы, вирусные векторы (например, адено-вирусный, ретровирусный) и тому подобное. Предпочтительно вектор экспрессии по настоящему изобретению содержит либо полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую тяжелую цепь или легкую цепь вышеописанного антитела по настоящему изобретению, либо как полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению, так и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую легкую цепь антитела по настоящему изобретению.

Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать промотор, функционально связанный с геном, который кодирует антитело против CTGF человека по настоящему изобретению или его вариабельную область тяжелой цепи, и/или вариабельную область легкой цепи. Промотор для экспрессии гена, кодирующего антитело по настоящему изобретению или его вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, в бактерии включает, например, промотор Trp, промотор lac, промотор gcsA, промотор λPL, промотор lpp, промотор tac и тому подобные, если хозяин является бактерией из рода Escherichia. Промотор для экспрессии в дрожжах включает, например, промотор PH05,

промотор PGK, промотор GAP и промотор ADH, и некоторые примеры промотора для экспрессии в бактерии рода *Bacillus* включают промотор SL01, промотор SP02, промотор *renP* и тому подобные. Если хозяин представляет собой эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающего, промотор включает промотор из SV40, промотор ретровируса, промотор белка теплового шока и тому подобное.

Если бактерию, в частности *Escherichia coli*, используют в качестве клетки-хозяина, вектор экспрессии по настоящему изобретению может дополнительно содержать инициирующий кодон, стоп-кодон, область терминатора и репликативную единицу. Если в качестве хозяина используют дрожжи, животную клетку или клетку насекомого, вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать инициирующий кодон и стоп-кодон. В этом случае он может содержать последовательность энхансера, не-кодирующие области на 5'-конце и 3'-конце гена, кодирующую антитело по настоящему изобретению или его вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи, сигнальную последовательность секреции, участок сплайсинга, область полиаденилирования, репликативную единицу или тому подобное. Кроме того, он может содержать обычно используемый селективный маркер (например, ген устойчивости к тетрациклину, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к неомицину, ген дигидрофолат редуктазы) в соответствии с предполагаемым использованием.

Настоящее изобретение также относится к трансформанту с введенным геном, кодирующим антитело по настоящему изобретению или его вариабельную область тяжелой цепи, и/или вариабельную область легкой цепи. Такой трансформант можно получать, например, трансформируя клетку-хозяина вектором экспрессии по настоящему изобретению. Клетка-хозяин, которую используют для получения трансформанта, не имеет конкретных ограничений при условии, что она подходит для вышеуказанного вектора экспрессии и является трансформируемой; примеры клетки-хозяина включают различные клетки, например природные клетки или искусственно созданные клетки, обычно используемые в области техники настоящего изобретения (например, бактерии (бактерии рода *Escherichia*, бактерии рода *Bacillus*), дрожжи (рода *Saccharomyces*, рода *Pichia* и тому подобные), клетки животных или клетки насекомых (например, Sf9) и тому подобные). Трансформацию можно осуществлять любым способом, известным как таковой.

Предпочтительно трансформант по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяина, трансформированную вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела по настоящему изобретению, или клетку-хозяин, трансформированную вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела по настоящему изобретению. Более предпочтительно трансформант по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяин, трансформированную вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению, как описано выше, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую легкую цепь антитела по настоящему изобретению, или клетку-хозяин, трансформированную вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела по настоящему изобретению, как описано выше, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую легкую цепь антитела по настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения антитела против СТГФ человека по настоящему изобретению, включающему экспрессирование гена, кодирующего антитело по настоящему изобретению или его вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, в клетке-хозяине, то есть с использованием такого трансформанта. Предпочтительно клетка-хозяин, используемая в способе, представляет собой клетку-хозяин, трансформированную вектором экспрессии по настоящему изобретению, как описано выше, и вектор экспрессии может содержать полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела по настоящему изобретению, отдельно или одновременно.

При получении антитела против СТГФ человека по настоящему изобретению трансформант можно культивировать в питательной среде. Питательная среда предпочтительно содержит источник углерода и источник неорганического азота или источник органического азота, которые необходимы для роста трансформанта. Примеры источника углерода включают глюкозу, декстран, растворимый крахмал, саха-розу и тому подобное; примеры источника неорганического азота или источника органического азота включают соли аммония, нитраты, аминокислоты, кукурузный экстракт, пептон, казеин, мясной экстракт, соевый жмых, картофельный экстракт и тому подобное. При желании, в среде могут содержаться и другие добавки (например, неорганические соли (например, хлорид кальция, дигидрофосфат натрия, хлорид магния), витамины, антибиотики (например, тетрациклин, неомицин, ампициллин, канамицин и тому подобное) и тому подобное).

Культивирование трансформанта осуществляют способом, известным как таковой. Условия культивирования, например температура, pH среды и время культивирования, выбирают соответствующим образом. Например, если хозяином является клетка животного, в качестве среды можно использовать среду MEM (Science, Vol. 122, p. 501, 1952), среду DMEM (Virology, Vol. 8, p. 396, 1959), среду RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc, Vol. 199, p. 519, 1967), среду 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950) и тому подобные, содержащие примерно от 5 до 20% эмбриональной бычьей сыворотки. pH среды предпочтительно составляет примерно 6-8, культивирование, как правило, проводят при температуре примерно от 30 до 40°C в течение примерно 15-72 ч, и при необходимости можно проводить аэрацию или перемешивание. Если хозяином является клетка насекомого, например, можно упомянуть среду Грейса (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985) и тому подобные, с содержанием эмбриональной бычьей сыворотки, и ее pH предпочтительно составляет примерно 5-8. Культивирование, как правило, проводят при температуре примерно от 20 до 40°C в течение 15-100 ч, и при необходимости можно проводить аэрацию или перемешивание. Если хозяином является бактерия, актиномицеты, дрожжи или мицелиальные грибы, подходящей является, например, жидкая среда, содержащая вышеописанные источники питательных веществ. Среда с pH 5-8 является предпочтительной. Если хозяином является E. coli, предпочтительные примеры среды включают среду LB, среду M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972) и тому подобные. В этом случае культивирование, как правило, можно проводить при температуре от 14 до 43°C в течение примерно 3-24 ч, при этом, при необходимости, проводить аэрацию или перемешивание. Если хозяином является бактерия рода Bacillus, культивирование, как правило, можно проводить при температуре от 30 до 40°C в течение примерно 16-96 ч, при этом, при необходимости, проводить аэрацию или перемешивание. Если хозяином являются дрожжи, примеры среды включают минимальную среду Буркхольдера (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980), и pH среды желательно составляет 5-8. Культивирование, как правило, проводят при температуре примерно от 20 до 35°C в течение примерно 14-144 ч, и при необходимости, можно проводить аэрацию или перемешивание.

При культивировании трансформанта, описанного выше, антитело против CTGF человека по настоящему изобретению можно извлекать, предпочтительно выделять и очищать из трансформанта. Примеры методов выделения и очистки включают методы, основанные на разнице в растворимости, такие как высаливание и осаждение растворителем; методы, основанные на разнице в молекулярной массе, такие как диализ, ультрафильтрация, гель-фильтрация и электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; методы, основанные на наличии электрического заряда, такие как ионообменная хроматография и хроматография на гидроксилапатите; методы, основанные на специфической аффинности, такие как аффинная хроматография; методы, основанные на различиях в гидрофобности, такие как обращенно-фазовая высокоеффективная жидкостная хроматография; методы, основанные на различиях в изоэлектрической точке, такие как изоэлектрофокусирование, и тому подобные.

Хотя настоящее изобретение, в целом, было описано выше, конкретные примеры приведены в данном документе лишь для лучшего понимания настоящего изобретения. Данные примеры предназначены исключительно для иллюстративных целей и не ограничивают объем настоящего изобретения.

#### Примеры

Процедуры, выполняемые с использованием набора или реагента и тому подобного, проводили в соответствии с прилагаемым протоколом, если не указано иное.

##### Пример 1. Получение белка CTGF из различных источников.

Авторы настоящего изобретения получали белок CTGF человека в качестве антигена для получения анти-CTGF антитела. Полноразмерный ген (SEQ ID NO: 13) CTGF человека лигировали в вектор экспрессии (pcDNA3.1; Invitrogen), и созданный таким образом вектор вводили генетическим методом в клетку Freestyle 293 (Invitrogen) с использованием реагента Freestyle MAX (Invitrogen) в качестве реагента для введения гена. Эту клетку культивировали в бессывороточной культуральной системе с использованием экспрессионной среды Freestyle 293 (Invitrogen), а затем получали культуральный супернатант, содержащий белок CTGF человека. Белок очищали из полученного таким образом культурального супернатанта, используя колонку с гепарином HiTrap и колонку с CM (GE Healthcare Japan), а затем использовали в экспериментах, как описано далее. Белки CTGF мыши, крысы и обезьяны получали таким же методом.

##### Пример 2. Иммунизация мыши VelocImmune.

Антитело для CTGF человека получали путем иммунизации мыши VelocImmune. В целях повышения разнообразия получаемых антител авторы настоящего изобретения исследовали множество методов иммунизации, маршрутов введения, адьювантов, периодов иммунизации и тому подобного. В качестве иммуногена использовали очищенный CTGF человека и смешивали его с адьювантом для проведения иммунизации. В качестве способов введения изучали введение в подушечки лап и внутрибрюшинное введение. В качестве адьюванта изучали TiterMax Gold (CytRx Corporation), полный адьюvant Фрейнда (Sigma) и неполный адьювант Фрейнда (Sigma). Кроме того, изучали добавление в качестве иммуностимулятора олигонуклеотида CpG и геля фосфата алюминия (производства BRENNTAG). Что касается периода иммунизации, иммунизацию проводили в течение периода времени от 3 до 14 недель. После неод-

нократной иммунизации у мышей брали образцы крови из хвостовой вены для контролирования титра и таким образом выбирали мышей VelocImmune, которые продуцировали антитела, связывающиеся с CTGF человека.

Титры измеряли стандартным методом ELISA, описанным ниже. 20 мкл раствора CTGF человека (1 мкг/мл) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) добавляли в планшет Maxisorp 384 (Nunc, Inc.) и иммобилизовали инкубацией в течение ночи при 4°C. На следующий день планшет промывали один раз 100 мкл промывающего раствора (TBST: трис-буфер, содержащий 0,05% Tween-20), а затем в него добавляли 100 мкл блокирующего раствора (PBS, содержащий 1% БСА) и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч. После однократного промывания 100 мкл промывающего раствора TBST готовили серию разведений плазмы из образцов крови и добавляли в планшет. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч и трехкратного промывания по 100 мкл промывающего раствора TBST в планшет добавляли антитело козы против IgG мыши, меченное пероксидазой хрена (HRP-антитело козы против IgG мыши; Zymed Laboratories, Inc.), которое разводили в 5000 раз промывающим раствором TBST, содержащим 0,1% БСА (20 мкл). После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч планшет промывали три раза по 100 мкл промывающего раствора TBST. После добавления 40 мкл хромогенного реагента TMB (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) в планшет и выдерживания при комнатной температуре в течение 10 мин добавляли 40 мкл останавливающего раствора (2 моль/л серной кислоты) для остановки реакции и измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

Пример 3. Получение гибридомы, продуцирующей антитело против CTGF человека.

Последнюю иммунизацию (внутривенным введением или внутрибрюшинным введением антигена) проводили для мыши, выбранной путем проверки возрастания титра антитела. Гибридому получали, собирая лимфоциты из удаленной селезенки и лимфатических узлов иммунизированных мышей общепринятым способом и проводя их слияние с клетками миеломы мыши SP2/0. Гибридому подвергали клонированию методом серийных разведений, а затем антитело очищали из супернатанта на колонке с протеином A или протеином G. (GE Healthcare Japan).

Пример 4. Анализ ELISA.

Авторы настоящего изобретения оценивали специфичность связывания антитела к CTGF методом ELISA. 20 мкл раствора CTGF человека (1 мкг/мл) в PBS добавляли в планшет Maxisorp 384 (Nunc, Inc.) и иммобилизовали инкубацией в течение ночи при 4°C. На следующий день планшет промывали один раз 100 мкл промывающего раствора (TPBS: PBS, содержащий 0,05% Tween-20), а затем в него добавляли 100 мкл блокирующего раствора (PBS, содержащий 1% БСА) и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1 ч. После однократного промывания 100 мкл промывающего раствора TBST готовили серию соответствующих разведений образца очищенного антитела и добавляли в планшет. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч планшет промывали три раза по 100 мкл промывающего раствора TBST и добавляли антитело козы против IgG мыши, меченное пероксидазой хрена (HRP-антитело козы против IgG мыши; Zymed Laboratories, Inc.), которое разводили в 5000 раз промывающим раствором TBST, содержащим 0,1% БСА (20 мкл). После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч планшет промывали три раза по 100 мкл промывающего раствора TBST. После добавления 40 мкл хромогенного реагента TMB (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) в планшет и выдерживания при комнатной температуре в течение 10 мин добавляли 40 мкл останавливающего раствора (2 моль/л серной кислоты) для остановки реакции и измеряли поглощение при длине волны 450 нм. Каждое из антител тестировали в двойном повторе и величину EC<sub>50</sub> определяли путем построения кривой по точкам.

В результате было подтверждено, что антитело, обозначенное 37-45, обладает высокой связывающей активностью (EC<sub>50</sub>: 1,6 нг/мл).

Пример 5. Секвенирование антитела.

Для идентификации антитела 37-45 авторы настоящего изобретения клонировали ген, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела из гибридомы. РНК экстрагировали из гибридомы и кДНК получали с использованием набора для амплификации кДНК (SMARTer RACE cDNA Amplification kit; Clontech). Затем проводили элонгацию и амплификацию вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи методом ПЦР. Проводили рекомбинацию ПЦР-продуктов с вектором для субклонирования ПЦР-продуктов, например pCR3.1-TOPO (Invitrogen), а затем ген секвенировали на секвенаторе (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems).

Определенная последовательность оснований вариабельной области тяжелой цепи антитела 37-45 приведена в SEQ ID NO: 1 и ее аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 2, а определенная последовательность оснований вариабельной области легкой цепи антитела 37-45 приведена в SEQ ID NO: 3 и ее аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 4.

Пример 6. Получение полностью человеческого антитела.

Для вышеописанного антитела вариабельная область получена из антитела человека, а константная область получена из антитела мыши. Вследствие этого, авторы настоящего изобретения заменили константную область из антитела мыши на константную область из антитела человека для получения полностью человеческого антитела (полностью человеческого 37-45). В частности, сигнальную последовательность связывали с 5'-концом гена вариабельной области тяжелой цепи антитела, и ген константной об-

ласти Igγ1 человека (Man Sung Co. и так далее (1992) J. Immunol. Vol. 148 (4): 1149-1154) связывали с 3'-концом гена вариабельной области тяжелой цепи антитела. Ген тяжелой цепи встраивали в вектор GS (Lonza Biologics) pEE6.4. При встраивании сайт распознавания фермента рестрикции BbvCI в гене превращали в последовательность ДНК, которая не влияет на аминокислотную последовательность антитела. Кроме того, сигнальную последовательность связывали с 5'-концом гена вариабельной области легкой цепи антитела и ген константной области κ-цепи человека (Man Sung Co. и так далее, выше) связывали с 3'-концом гена вариабельной области легкой цепи антитела. Ген легкой цепи встраивали в вектор GS pEE12.4.

Для тяжелой цепи полученного полностью человеческого антитела 37-45 последовательность оснований приведена в SEQ ID NO: 5 и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 6, а для легкой цепи антитела последовательность оснований приведена в SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 8.

Пример 7. Получение варианта сайта гликозилирования вариабельной области.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи полностью человеческого антитела 37-45, описанного выше, содержит последовательность мотива гликозилирования N-типа N-X-(T/S). В частности, в вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, Asn в положении 58 в соответствии с нумерацией Kabat соответствует сайту гликозилирования. В случае присутствия сайта гликозилирования во время культивирования клеток происходит добавление сахарных цепей к антителу, однако известно, что добавление сахарных цепей зависит от условий культивирования или хозяина для экспрессии. То есть даже в случае одинаковых производящих антитело клеток, полученных таким образом, существует вероятность того, что степень добавления сахарных цепей будет меняться в зависимости от условий культивирования (среды, концентрации клеток и тому подобного), и существует также вероятность того, что возникнут сложности с получением медицинского препарата антитела одинакового качества. Вследствие этого, авторы настоящего изобретения получили полностью человеческое антитело (полностью человеческое 37-45-МН1), в котором внесены мутации в вариабельную область тяжелой цепи полностью человеческого антитела 37-45.

Для вариабельной области тяжелой цепи полученного полностью человеческого антитела 37-45-МН1 последовательность оснований приведена в SEQ ID NO: 9 и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 10. Для тяжелой цепи полученного полностью человеческого антитела 37-45-МН1 последовательность оснований приведена в SEQ ID NO: 11 и аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 12. Легкая цепь полностью человеческого антитела 37-45-МН1 является такой же, как легкая цепь полностью человеческого антитела 37-45.

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи полностью человеческого антитела 37-45-МН1 составляют область из положений 31-35, 50-65 и 95-102 в вариабельной области тяжелой цепи, согласно нумерации Kabat, соответственно, что соответствует аминокислотной последовательности в положениях 31-35, 50-66 и 99-108 в SEQ ID NO: 10 соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи полностью человеческого антитела 37-45-МН1 составляют область из положений 24-34, 50-56 и 89-97 в вариабельной области легкой цепи, согласно нумерации Kabat, соответственно, что соответствует аминокислотной последовательности в положениях 24-35, 51-57 и 90-98 в SEQ ID NO: 4 соответственно.

Пример 8. Экспрессия и очистка полностью человеческого антитела.

Вектор GS, в который гены тяжелой цепи и легкой цепи каждого описанного выше антитела, полностью человеческого 37-45 и полностью человеческого 37-45-МН1, были встроены, расщепляли ферментами рестрикции NotI и PvuII и лигировали с использованием набора Ligation-Convenience (NIPPON-GENE) или Ligation-high (TOYOBIO) для конструирования вектора GS, в котором были встроены гены как тяжелой цепи, так и легкой цепи. Этот вектор кодирует полноразмерные тяжелую и легкую цепи, и глутамин-синтетазу, и он был трансфицирован в клетки CHO-R1SV для экспрессии антитела. Культуральный супернатант очищали на колонке с протеином A или протеином G (GE Healthcare Japan) для получения в очищенном виде каждого из полностью человеческих антител.

Пример 9. Анализ ELISA полностью человеческого антитела.

Авторы настоящего изобретения оценивали специфичность связывания полностью человеческого антитела 37-45 и полностью человеческого антитела 37-45-МН1, полученных в приведенных выше примерах, в отношении CTGF человека, мыши, крысы и обезьяны методом ELISA. В данном случае использовали тот же метод, который описан в примере 4, но с использованием антитела кролика против IgG человека, меченного пероксидазой хрина (HRP-антитело кролика против IgG человека; DAKO), которое разводили в 5000 раз промывающим раствором TBST, содержащим 0,1% БСА, в качестве вторичного антитела. Тест для каждого антитела проводили в двойном повторе, и величину EC<sub>50</sub> определяли путем построения кривой по точкам.

В результате было обнаружено, что все полностью человеческие антитела обладали связывающей способностью в равной степени для CTGF человека, мыши, крысы и обезьяны.

Таблица 1

Связывающая активность полностью человеческого антитела в отношении различных CTGF

	Полностью человеческое 37-45- EC50 (нг/мл)	Полностью человеческое 37-45- МН1 EC50 (нг/мл)
CTGF человека	13, 2	10, 4
CTGF мыши	12, 4	9, 2
CTGF крысы	13, 1	9, 2
CTGF обезьяны	12, 5	8, 6

Пример 10. Оценка связывающей активности в анализе ППР.

Для измерения антиген-специфической связывающей активности полностью человеческого антитела 37-45-МН1 более детально авторы настоящего изобретения проводили анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). В настоящем примере антитело против CTGF человека CLN1 (патентный документ 2) было использовано в качестве антитела сравнения.

Для проведения анализа ППР использовали систему Biacore 2000 (GE Healthcare Japan). Анти-CTGF антитело иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием набора Human Antibody Capture Kit и набора Amine Coupling Kit (GE Healthcare Japan). Делали серийные разведения CTGF человека, полученного в примере 1, в растворе HBS-EP (GE Healthcare Japan). 100 мкл разведенного раствора добавляли в поток при скорости потока 50 мкл/мин. С помощью данной измерительной системы рассчитывали константу скорости ассоциации ( $k_a$ ), константу скорости диссоциации ( $k_d$ ) и константу диссоциации ( $KD$ ) между человеческим белком CTGF и анти-CTGF антителом, используя программу для анализа данных (BIA Evaluation).

Таблица 2

Связывающая активность полностью человеческого антитела 37-45-МН1  
в отношении CTGF человека, определенная в анализе ППР

	KD (M)	Kd (1/c)
Полностью человеческое 37-45-МН1	$3,7 \times 10^{-11}$	$1,6 \times 10^{-4}$
CLN1	$4,6 \times 10^{-10}$	$3,7 \times 10^{-3}$

В результате было обнаружено, что полностью человеческое антитело 37-45-МН1 обладало связывающей активностью в отношении CTGF человека, превышающей в 12 или более раз таковую у антитела CLN1.

Пример 11. Ингибирующее действие на синтез коллагена в клетках из почки крысы.

Авторы настоящего изобретения изучали ингибирующее действие на индуцированный TGF $\beta$  синтез коллагена в фибробластах крысы NRK-49F для измерения антиген-специфического нейтрализующего действия полностью человеческого антитела 37-45-МН1. В настоящем примере CLN1 использовали в качестве антитела сравнения.

Клетки NRK-49F (полученные из ATCC) продуцируют CTGF при добавлении TGF $\beta$ . Клетки NRK-49F высевали в 24-луночный планшет в содержащей 10% ЭТС среде DMEM ( $5 \times 10^4$  клеток), и через 24 ч среду заменяли на содержащую 0,01% ЭТС среду DMEM (500 мкл).

Затем через 24 ч к среде добавляли TGF $\beta$  (R&D Systems; 1 нг/мл). За 1 ч до добавления TGF $\beta$  добавляли антитела против CTGF человека, полностью человеческое 37-45-МН1 или CLN1 (в три группы лунок при концентрации 1 мкг/мл, 3 мкг/мл и 10 мкг/мл). Через 72 ч супернатант собирали, подвергали SDS-ПААГ и проводили обычный анализ методом вестерн-блоттинга с использованием антитела против коллагена I типа (Abcam plc). В результате было обнаружено, что полностью человеческое антитело 37-45-МН1 обладает сильной способностью ингибировать синтез коллагена по сравнению с CLN1 зависимым от концентрации образом.

Пример 12. Оценочный тест на функцию почек в мышиной модели культуры почки.

Гломерулосклероз и дегенерация почечных канальцев часто имеют место при различных почечных нарушениях, вызывающих хронические почечные заболевания. Эти хронические почечные заболевания можно изучать на мышиной модели культуры почки, в которой проявляются прогрессирующие почечные нарушения. В данной модели нагрузка переносится на оставшуюся часть почки в результате нефрэктомии 2/3 почки с одной стороны и полной нефрэктомии с другой стороны (нефрэктомия 5/6), тем самым индуцируется протеинурия и значительное снижение функций почки, а также наблюдается гистопатологический склероз почечных клубочков или дегенерация почечных канальцев, и наблюдается легкий интерстициальный фиброз (см., например, Kidney International, 64, 350-355, 2003).

Нефрэктомию 5/6 проводили по методу Zhang, et al. (Kidney International, 56, 549-558, 1999). 9-Недельного самца мыши ICR (Japan SLC, Inc., Hamamatsu-shi, Shizuoka-ken) анестезировали внутрибрюшинным введением пентобарбитала (50 мг/кг) и проводили резекцию 1/3 со стороны головы и 1/3 со сто-

роны хвоста в левой почке. Через неделю после первой операции мышь анестезировали внутрибрюшинным введением пентобарбитала (50 мг/кг) и правую почку полностью удаляли для завершения нефрэктомии 5/6.

Сбор мочи и отбор образцов крови проводили через одну неделю после нефрэктомии 5/6 и измеряли скорость экскреции белка с мочой и параметры почечной функции (концентрацию креатинина в сыворотке и клиренс креатинина). Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд (Bio-Rad Laboratories). Концентрацию креатинина измеряли при помощи набора CRE-EN Kainos (Kainos Laboratories, Inc.). Скорость экскреции белка с мочой рассчитывали, корректируя концентрацию белка в моче (мг/мл) на концентрацию креатинина в моче (мг/дл). Скорость экскреции белка с мочой, концентрацию креатинина в сыворотке и клиренс креатинина использовали в качестве индикаторов, и таким образом, группы животных делили на группу, получающую растворитель (введение фосфатного буфера с pH 7,4), и группу введения антитела (15 мышей на группу). Испытания начинали с установления доз антител для трех групп, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 2 мг/кг. Фосфатный буфер и полностью человеческое антитело 37-45-MH1 вводили подкожной инъекцией в область спины один раз в неделю (в общей сложности шесть доз). В начале испытания, в недели 4 и 6 от начала испытания, собирали образцы мочи и образцы крови и измеряли скорость экскреции белка с мочой, концентрацию креатинина в сыворотке и клиренс креатинина.

Что касается скорости экскреции белка с мочой, в момент начала испытания в группе, получавшей растворитель, скорость экскреции белка с мочой возрастала по сравнению с нормальной группой (нормальная группа  $5,1 \pm 0,4$ ; группа, получавшая растворитель,  $9,7 \pm 0,7$  ( $P < 0,01$ )). Также в недели 4 и 6 от начала испытания в группе, получавшей растворитель, скорость экскреции белка с мочой возрастала по сравнению с нормальной группой. С другой стороны, в группах, получавших антитело (группа 1 мг/кг и группа 2 мг/кг), хотя не было выявлено статистически значимых различий, скорость экскреции белка с мочой снижалась в зависимости от дозы по сравнению с группой, получавшей растворитель.

Что касается концентрации креатинина в сыворотке, в момент начала испытания в группе, получавшей растворитель, концентрация креатинина в сыворотке увеличивалась по сравнению с нормальной группой (нормальная группа  $0,36 \pm 0,013$  мг/дл; группа, получавшая растворитель,  $0,53 \pm 0,016$  мг/дл ( $P < 0,01$ )). Затем также в недели 4 и 6 в группе, получавшей растворитель, концентрация креатинина в сыворотке увеличивалась по сравнению с нормальной группой (неделя 4: нормальная группа  $0,42 \pm 0,025$  мг/дл; группа, получавшая растворитель,  $0,66 \pm 0,037$  мг/дл ( $P < 0,01$ ), неделя 6: нормальная группа  $0,31 \pm 0,016$  мг/дл; группа, получавшая растворитель,  $0,81 \pm 0,126$  мг/дл ( $P < 0,05$ )). Что касается групп, получавших антитело, в группе 0,5 мг/кг, хотя не было выявлено статистически значимых различий, концентрация креатинина в сыворотке уменьшалась в недели 4 и 6 по сравнению с группой, получавшей растворитель. Кроме того, в группе 1 мг/кг и группе 2 мг/кг увеличение концентрации креатинина в сыворотке было в значительной степени ингибирировано по сравнению с группой, получавшей растворитель (неделя 4: группа 1 мг/кг  $0,51 \pm 0,022$  мг/дл ( $P < 0,05$ ); группа 2 мг/кг  $0,51 \pm 0,015$  мг/дл ( $P < 0,05$ ), неделя 6: группа 1 мг/кг  $0,55 \pm 0,043$  мг/дл ( $P < 0,05$ ); группа 2 мг/кг  $0,49 \pm 0,024$  мг/дл ( $P < 0,01$ )).

Что касается клиренса креатинина (концентрация креатинина в моче  $\times$  количество мочи за 24 ч/концентрация креатинина в сыворотке), в момент начала испытания в группе, получавшей растворитель, было подтверждено снижение клиренса креатинина по сравнению с нормальной группой (нормальная группа  $1,8 \pm 0,18$ ; группа, получавшая растворитель,  $1,3 \pm 0,08$  ( $P < 0,01$ )). Затем, также в недели 4 и 6 в группе, получавшей растворитель, клиренс креатинина снижался по сравнению с нормальной группой (неделя 4: нормальная группа  $2,1 \pm 0,16$ ; группа, получавшая растворитель,  $1,6 \pm 0,16$ , неделя 6: нормальная группа  $2,8 \pm 0,29$ ; группа, получавшая растворитель,  $1,4 \pm 0,17$  ( $P < 0,001$ )). Что касается групп, получавших антитело, в группе 0,5 мг/кг ингибирование снижения клиренса креатинина по сравнению с группой, получавшей растворитель, не было подтверждено. С другой стороны, в группе 1 мг/кг в недели 4 и 6 снижение клиренса креатинина было в значительной степени ингибирировано по сравнению с группой, получавшей растворитель (неделя 4: группа, получавшая растворитель,  $1,6 \pm 0,16$ ; группа 1 мг/кг  $2,1 \pm 0,11$  ( $P < 0,05$ ), неделя 6: группа, получавшая растворитель,  $1,4 \pm 0,17$ ; группа 1 мг/кг  $2,0 \pm 0,18$  ( $P < 0,05$ )). Кроме того, в группе 2 мг/кг в неделю 6 снижение клиренса креатинина было в значительной степени ингибирировано по сравнению с группой, получавшей растворитель (неделя 6: группа, получавшая растворитель,  $1,4 \pm 0,17$ ; группа 2 мг/кг  $1,9 \pm 0,14$  ( $P < 0,05$ )).

Данные результаты послужили подтверждением того, что полностью человеческое антитело 37-45-MH1 ингибирует снижение функций почек в модели хронической почечной недостаточности.

Пример 13. Фармакологический оценочный тест в крысиных моделях нефрита.

Крысиные модели анти-Thy 1.1 являются признанными моделями мезангимального пролиферативного гломерулонефрита, с патологическими состояниями, проявляющимися при инъекции антител к антигенам Thy на поверхности мезангимальных клеток в почечных клубочках (см., например, Yamamoto and Wilson, 1987 Kidney Int. 32: 514-25; Morita, et al., 1998 Am J. Kidney Dis 31: 559-73). В настоящих моделях после лизиса мезангимальных клеток увеличиваются пролиферация мезангимальных клеток и внеклеточный матрикс и возрастает уровень белка в моче (см., например, Floege, et al., 1991 Kidney Int. 40: 477-88; Ito, et al., 2001 J. Am Soc Nephrol. 12: 472-84). Модели анти-Thy 1.1 напоминают IgA-нефропатию или

пурпур Геноха-Шенлейна у человека, и прогрессирование патологических состояний можно предсказывать, используя модели, характеризующиеся протеинурией в качестве индикатора (см., например, Kasuga, et al., 2001 Kidney Int. 60: 1745-55, Liu, et al., 2007 Nephron Exp Nephrol. 105: e65-74).

Готовили раствор анти-Thy 1.1 антитела (моно克лональные антитела/асциты против CD90 (Thy 1.1) крысы; CEDARLANE) с концентрацией 0,1 г/мл в физиологическом солевом растворе. Нефрит индуцировали внутривенным введением раствора антитела крысам (200 мкл на 100 г массы тела). Через 4 ч после введения анти-Thy 1.1 антитела внутривенно вводили полностью человеческое антитело 37-45-MH1 (0,5 мг/кг, 1 мг/кг или 2 мг/кг) или растворитель (PBS). Мочу собирали в течение 24 ч через 3-4 дня после индукции патогенеза и измеряли количество экскретированного с мочой белка за 24 ч (UP) и скорость экскреции белка с мочой (UP/uCr: концентрацию белка в моче (мг/мл) корректировали на концентрацию креатинина в моче (мг/дл)). Полученные результаты приведены в табл. 3 (UP) и табл. 4 (UP/uCr).

Таблица 3

## UP

	UP (мг/сутки)	Степень ингибирования (%) относительно группы введения растворителя	p- значение
Группа нормальных животных	1,9	100,0	
Группа введения растворителя (PBS)	114,3	0,0	p<0,001#
Полностью человеческое 37-45-MH1 0,5 мг/кг	115,2	-0,8	
Полностью человеческое 37-45-MH1 1 мг/кг	95,5	16,8	
Полностью человеческое 37-45-MH1 2 мг/кг	83,8	27,2	p=0,029*

#: относительно группы нормальных животных, критерий Стьюдента

\*: относительно группы введения растворителя, критерий Даннета

Таблица 4

## UP/uCr

	UP/uCr (мг/мг)	Степень ингибирования (%) относительно группы введения растворителя	p- значение
Группа нормальных животных	0,315	100,0	
Группа введения растворителя (PBS)	33,865	0,0	p<0,001#
Полностью человеческое 37-45-MH1 0,5 мг/кг	26,280	22,6	
Полностью человеческое 37-45-MH1 1 мг/кг	22,487	33,9	p=0,037*
Полностью человеческое 37-45-MH1 2 мг/кг	18,427	46,0	p=0,0039*

#: относительно группы нормальных животных, критерий Стьюдента

\*: относительно группы введения растворителя, критерий Даннета

Результаты продемонстрировали, что полностью человеческое антитело 37-45-MH1 ингибировало протеинурию зависимым от дозы образом, и степени ингибирования в группе 2 мг/кг составляли 27,2% и

46,0% относительно группы введения растворителя, соответственно, для показателей UP и UP/uCr.

Далее с целью выявления отличий от CLN1 по силе действия использовали одни и те же модели для оценки. Процедура оценки была такой же, как описано выше. Для оценки с учетом доз, которые были эффективны согласно вышеуказанным результатам, полностью человеческое антитело 37-45-MH1 в дозе 2 мг/кг использовали в качестве положительного контроля, а CLN1 использовали в дозе 2 мг/кг и в 10 раз большей дозе, 20 мг/кг. Кроме того, в целях изучения влияния неспецифической иммунной реакции при лечении гетерогенетическими антителами, в качестве контроля использовали человеческое IgG1 антитело (анти-KLH (гемоцианин лимфы улитки) антитело в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг; его получали путем иммунизации KLH мыши VelocImmune и получения полностью человеческого IgG1 таким же образом, как и полностью человеческого антитела 37-45-MH1). Полученные результаты приведены в табл. 5 (UP) и табл. 6 (UP/uCr).

Таблица 5

## UP

	UP (мг/день)	Степень ингибиции (%) относительно группы введения растворителя	p- значение	Степень ингибиции (%) относительно группы введения IgG	p- значение
Группа нормальных животных	0,8	100,0		100,0	
Группа введения растворителя (PBS)	111,1	0,0	p<0,001#		
Контрольные IgG 2 мг/кг	114,5	-3,1		0,0	p<0,001#
Контрольные IgG 20 мг/кг	113,4	-2,1		0,0	p<0,001#
CLN1 2 мг/кг	97,2	12,6	p=0,45*	15,2	p=0,22&
CLN1 20 мг/кг	107,3	3,5	p=0,79*	5,4	p=0,53\$
Полностью человеческое 37-45-MH1 2 мг/кг	79,0	29,1	p=0,044*	31,2	p=0,0011 &

#: относительно группы нормальных животных, критерий Стьюдента

\*: относительно группы введения растворителя, критерий Стьюдента

&: относительно группы контрольных IgG2 мг/кг, критерий Стьюдента

\$: относительно группы контрольных IgG20 мг/кг, критерий Стьюдента.

Таблица 6

## UP/uCr

	UP/uCr (мг/мг)	Степень ингибиции (%) относительно группы введения растворителя	p- значение	Степень ингибиции (%) относительно группы введения IgG	p- значение
Группа нормальных животных	0,3	100,0		100,0	
Группа введения растворителя (PBS)	46,1	0,0	p<0,001#		
Контрольные IgG 2 мг/кг	52,2	-13,4		0,0	p<0,001#
Контрольные IgG 20 мг/кг	42,7	7,5		0,0	p<0,001#
CLN1 2 мг/кг	36,3	21,5	p=0,18*	30,8	p=0,030&
CLN1 20 мг/кг	41,8	9,5	p=0,49*	2,2	p=0,82\$
Полностью человеческое 37-45-MH1 2 мг/кг	28,1	39,2	p=0,0092*	46,4	P<0,001&

#: относительно группы нормальных животных, критерий Стьюдента

\*: относительно группы введения растворителя, критерий Стьюдента

&amp;: относительно группы контрольных IgG2 мг/кг, критерий Стьюдента

\$: относительно группы контрольных IgG20 мг/кг, критерий Стьюдента.

Результаты показали, что патологические состояния проявлялись практически в такой же степени, что и в предыдущем эксперименте. Кроме того, полностью человеческое антитело 37-45-MH1 в дозе 2 мг/кг продемонстрировало практически такую же степень ингибиции, что и в предыдущем эксперименте, и степени ингибиции составляли 29,1 и 39,2%, соответственно, для показателей UP и UP/uCr, и в случае с использованием группы введения растворителя в качестве контроля.

С другой стороны, антитело CLN1 в меньшей степени оказывало ингибирующее действие на протеинурию по сравнению с полностью человеческим антителом 37-45-MH1 (степени ингибиции относительно группы введения растворителя составляли 12,6 и 21,5%, соответственно, для показателей UP и UP/uCr при дозе 2 мг/кг, и степени ингибиции относительно группы введения растворителя составляли 3,5 и 9,5%, соответственно, для показателей UP и UP/uCr при дозе 20 мг/кг). Кроме того, что касается человеческого IgG1 антитела, оно оказывало крайне незначительное влияние на протеинурию.

Полученные результаты подтвердили, что полностью человеческое антитело 37-45-MH1 оказывает сильное ингибирующее действие на протеинурию по сравнению с CLN1.

**Промышленная применимость**

Антитело против CTGF человека по настоящему изобретению полезно для профилактики или лечения различных заболеваний, в патогенез которых вовлечен CTGF, в том числе почечных заболеваний, таких как хроническая почечная недостаточность и диабетическая нефропатия.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> НОВОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ СТГФ ЧЕЛОВЕКА

<130> A12037A00

<150> JP2011-281811

<151> 2011-12-22

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 357

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ген VH антитела против СТГФ человека

<400> 1

caggtgcagc tggtgcaagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggta 60

tcctgcaagg cttctggata cacccaccggctactata tgtattgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagt gatggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaactat 180

tcacagaagt ttccagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt 300

aagtggaaact accctttga ctactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 2

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH антитела против СТГФ человека

<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

**029290**

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> 3  
<211> 327  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> ген VL антитела против CTGF человека

<400> 3  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattcca gaagggccac tggcatccca 180  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
cctgaagatt ttgttagtgta tttctgtcag cagtatgtca gcacaccgtg gacgttcggc 300  
caagggacca aggtggaaat caaacgg 327

<210> 4  
<211> 109  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL антитела против CTGF человека

<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> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ген Н-цепи антитела против СТГФ человека

<400> 5		
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60	
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgcacaggcc	120	
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaactat	180	
tcacagaagt ttccagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcg cacagcctac	240	
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt	300	
aagtggaaact accctttga ctactgggc cagggAACCC tggtcacccgt ctctcagcc	360	
tccaccaagg gcccattcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggggc	420	
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcggtgg	480	
aactcaggcg ccctgaccag cggcggtcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga	540	
ctctactccc ttagtagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600	
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaaagt tgagccaaa	660	
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccgacac ctgaactcct ggggggaccg	720	
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccccg gacccttag	780	
gtcacatgcg tgggtggta cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggta	840	
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900	
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960	
tacaagtgcg aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaaac catctccaaa	1020	
gccaaagggc agcccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccccg ggatgagctg	1080	
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc	1140	
gtggagtgaa agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccctgtgt	1200	
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260	

**029290**

caggggaacg tcttctcatg ctccgtatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320  
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 6  
<211> 449  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Н-цепь антитела против CTGF человека

<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

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

**029290**

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

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> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ген L-цепи антитела против СТГФ человека

<400> 7

gaaatttgtt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatacca	gaagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttttagtgtta	tttctgttag	cagtatgtca	gcacaccgtg	gacgttcgge	300
caagggacca	aggtggaaat	caaacggact	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccc	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	cacccatcag	600
ggcctgagct	cgcccggtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttag		648

<210> 8  
 <211> 215  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> L-цепь антитела против СТГФ человека

<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					
----	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	--	--	--

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

<210> 9  
 <211> 357  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ген VH антитела против CTGF человека

<400> 9	
caggtgcagc tggtgcaagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tctctggata cacttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaactat	180
gcccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac	240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt	300
aagtggaaact accctttga ctactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctca	357

<210> 10  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH антитела против CTGF человека

<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

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> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Н-цепь антитела против СTGF человека

<400> 11 caggtgcagc tggcagtc tgcccgag gtgaagaagc ctggccctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttctggata cacccatcacc ggctactata tgtattgggt gcgcacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaactat 180  
gcccaagaat ttccaggcag ggtcaccatg accaggaca cgtccatcag cacagcctac 240  
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt 300  
aagtggaaact accctttga ctactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcctcagcc 360

**029290**

tccaccaagg gcccattcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcggtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcgagga	540
ctctactccc ttagtagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaaagt tgagcccaa	660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
tcaagtcttc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tcatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtggtaa cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggta	840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgcg aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agcccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc	1140
gtggagtgaa agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccctgtctg	1200
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgtatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga	1350

<210> 12

<211> 449

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Н-цепь антитела против СТГФ человека

<400> 12

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

**029290**

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

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

**029290**

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> 13  
<211> 1050  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
atgaccgcgg ccagtatggg ccccggtccgc gtcgccttcg tggtcctcct cgccctctgc 60  
agccggccgg ccgtcggcca gaactgcagc gggccgtgcc ggtgccccgga cgagccggcg 120  
ccgcgcgtgcc cggcggggcggt gaggctcgtg ctggacggct gcggctgtgc ccgcgtctgc 180  
gccaaggcagc tggcgagct gtgcaccgag cgcgaccctt gcgaccggca caagggcctc 240  
ttctgtgact tcggctcccc ggccaaccgc aagatcggcg tgtgcaccgc caaagatgg 300  
gctccctgca tcttcggtgac tacggtgtac cgcaacggag agtccttcca gagcagctgc 360  
aagtaccagt gcacgtgcct ggacggggcg gtggcgtca tgcccctgtc cagcatggac 420  
gttcgtctgc ccagccctga ctgccccttc ccgaggagg tcaagctgcc cggaaatgc 480  
tgcgaggagt gggtgtgtga cgagccaaag gaccaaaccg tggttgggcc tgccctcg 540  
gcttaccgac tggaagacac gtttggcca gaccaacta tgattagagc caactgcctg 600  
gtccagacca cagagtggag cgccgtttcc aagacctgtg ggtatggcat ctccacccgg 660

**029290**

gttaccaatg acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg 720  
ccttgcgaag ctgacctgga agagaacatt aagaaggca aaaagtgcatt ccgtactccc 780  
aaaatctcca agcctatcaa gtttgagctt tctggctgca ccagcatgaa gacataccga 840  
gctaaattct gtggagttatg taccgacggc cgatgctgca ccccccacag aaccaccacc 900  
ctgccgtgg agttcaagtgc ccctgacggc gaggtcatga agaagaacat gatgttcatc 960  
aagacctgtg cctgccatTA caactgtccc ggagacaatg acatcttga atcgctgtac 1020  
tacaggaaga tgtacggaga catggcatga 1050

<210> 14  
<211> 349  
<212> Белок  
<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

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
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		
325	330	335
Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala		
340	345	

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против фактора роста соединительной ткани (CTGF) человека или фрагмент антитела против CTGF человека, выбранный из фрагмента одноцепочечной вариабельной области, Fab, Fab' или F(ab')<sub>2</sub>, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 99-108 в SEQ ID NO: 10; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 24-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 51-57 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в положениях 90-98 в SEQ ID NO: 4.

2. Антитело против CTGF человека или фрагмент антитела против CTGF человека по п.1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

3. Антитело против CTGF человека или фрагмент антитела против CTGF человека по п.2, в котором

константная область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела представляет собой константную область Igγ1 человека.

4. Антитело против CTGF человека или фрагмент антитела против CTGF человека по п.2, в котором константная область легкой цепи антитела или фрагмента антитела представляет собой константную область Igκ человека.

5. Антитело против CTGF человека или фрагмент антитела против CTGF человека по п.2, в котором константная область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела представляет собой константную область Igγ1 человека и константная область легкой цепи антитела или фрагмента антитела представляет собой константную область Igκ человека.

6. Антитело против CTGF человека по п.2, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12; и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

7. Полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела по п.2.

8. Полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или фрагмента антитела по п.2.

9. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.7 и/или 8.

10. Клетка-хозяин для получения антитела против CTGF человека или фрагмента антитела против CTGF человека, выбранного из фрагмента одноцепочечной вариабельной области, Fab, Fab' или F(ab')<sub>2</sub>, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из следующих (а) и (б):

(а) клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и

(б) клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

11. Клетка-хозяин для получения антитела против CTGF человека, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из следующих (а) и (б):

(а) клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(б) клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

12. Способ получения антитела против CTGF человека или фрагмента антитела против CTGF по п.1, включающий обеспечение экспрессии антитела против CTGF человека или фрагмента антитела против CTGF человека путем культивирования клетки-хозяина по п.10 в условиях, обеспечивающих экспрессию.

13. Способ получения антитела против CTGF человека по п.1, включающий обеспечение экспрессии антитела против CTGF человека путем культивирования клетки-хозяина по п.11 в условиях, обеспечивающих экспрессию.

14. Антитело против CTGF человека или фрагмент антитела против CTGF человека, выбранный из фрагмента одноцепочечной вариабельной области, Fab, Fab' или F(ab')<sub>2</sub>, полученные способом, включающим культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или фрагмента антитела, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из следующих (а) и (б):

(а) клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и

(б) клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид,

содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

15. Антитело против CTGF человека, полученное способом, включающим культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела, причем клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из следующих (а) и (б):

(а) клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(б) клетки-хозяина, трансформированной вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

16. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания, в патогенез которого вовлечен CTGF человека, содержащая антитело против CTGF человека или фрагмент антитела против CTGF человека по любому из пп.1-6, 14 и 15 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

