



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201333034 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：101148989

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/22 (2006.01)**

(30)優先權：2011/12/22 日本 2011-281811

(71)申請人：安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)
日本

(72)發明人：岩崎正司 IWASAKI, SHOJI (JP)；守屋隆一 MORIYA, RYUICHI (JP)；吉野正康
YOSHINO, MASAYASU (JP)；高倉浩二 TAKAKURA, KOJI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 59 頁

(54)名稱

新穎抗人類 C T G F 抗體

NOVEL ANTI-HUMAN CTGF ANTIBODY

(57)摘要

本發明之課題係提供與傳統之抗人類 CTGF 抗體比較，結合活性及/或中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體，以及使用該抗人類 CTGF 抗體之包含慢性腎臟病或糖尿病性腎病等之腎臟疾病之人類 CTGF 參與病態形成之各種疾病之預防或治療方法。本發明之解決手段係含序列號碼 10 所示之胺基酸序列而成之重鏈可變區、及序列號碼 4 所示之胺基酸序列而成之輕鏈可變區之抗人類 CTGF 抗體。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201333034 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：101148989

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/22 (2006.01)**

(30)優先權：2011/12/22 日本 2011-281811

(71)申請人：安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)
日本

(72)發明人：岩崎正司 IWASAKI, SHOJI (JP)；守屋隆一 MORIYA, RYUICHI (JP)；吉野正康
YOSHINO, MASAYASU (JP)；高倉浩二 TAKAKURA, KOJI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 59 頁

(54)名稱

新穎抗人類 C T G F 抗體

NOVEL ANTI-HUMAN CTGF ANTIBODY

(57)摘要

本發明之課題係提供與傳統之抗人類 CTGF 抗體比較，結合活性及/或中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體，以及使用該抗人類 CTGF 抗體之包含慢性腎臟病或糖尿病性腎病等之腎臟疾病之人類 CTGF 參與病態形成之各種疾病之預防或治療方法。本發明之解決手段係含序列號碼 10 所示之胺基酸序列而成之重鏈可變區、及序列號碼 4 所示之胺基酸序列而成之輕鏈可變區之抗人類 CTGF 抗體。

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101148989

※申請日：101 年 12 月 21 日

※IPC 分類：C07K 16/22 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

新穎抗人類 CTGF 抗體

Novel anti-human CTGF antibody

二、中文發明摘要：

本發明之課題係提供與傳統之抗人類 CTGF 抗體比較，結合活性及/或中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體，以及使用該抗人類 CTGF 抗體之包含慢性腎臟病或糖尿病性腎病等之腎臟疾病之人類 CTGF 參與病態形成之各種疾病之預防或治療方法。

本發明之解決手段係含序列號碼 10 所示之胺基酸序列而成之重鏈可變區、及序列號碼 4 所示之胺基酸序列而成之輕鏈可變區之抗人類 CTGF 抗體。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎抗人類 CTGF 抗體。詳細而言，本發明之新穎抗人類 CTGF 抗體與傳統的抗人類 CTGF 抗體比較，係結合活性及/或中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體。

【先前技術】

CTGF（結締組織生長因子）係屬於 CCN 家族之分子量約為 36~38kDa 之富含半胱胺酸殘基之分泌蛋白質（非專利文獻 1），傳統上，已知係被認為於纖維化中最重要的增殖因子之 TGF- β 所誘發（非專利文獻 2）。因此，推測 TGF- β 誘發 CTGF，所誘發之 CTGF 促進臟器或組織之纖維化，認為 CTGF 係於纖維化、細胞增殖、細胞外基質之代謝、血管形成、動脈硬化等，扮演重要角色（非專利文獻 3）。

CTGF 存在許多區域（domain），與其他的因子相互作用。其中，藉由 von Willebrand Factor type C domain，CTGF 與 TGF- β 或 BMP4 直接結合，顯示發生促進 TGF- β 訊號或抑制 BMP 訊號（非專利文獻 4）。

揭示 CTGF 係於各種腎臟疾病（例如慢性腎臟病、糖尿病性腎病、絲球體硬化症、IgA 腎臟病、巢狀分節性絲球體硬化症、ANCA 相關腎炎、急速進行性腎絲球體腎炎、慢性移植腎病、腎病症候群（Nephrotic syndrome）、狼瘡腎炎（lupus nephritis）、膜狀增生性

腎絲球體腎炎)中表現亢進(非專利文獻5)、纖維化密切相關(非專利文獻6)。

另外,報告揭示CTGF係與各種纖維症(硬皮症(scleroderma)、間質性肺病、特發性肺纖維化病等之肺纖維症、由慢性B型或C型肝炎所發生之纖維症、放射線誘發性纖維症、由創傷治癒所產生之纖維症、及心臟肥大及纖維症)或血管增殖性疾病、糖尿病性網膜症、癌等有關,認為成為新的治療目標(非專利文獻7、8)。

因此,若能開發特異地結合於CTGF,具有抑制CTGF所引起之各種作用之活性之單株抗體,可期待適用於診斷、預防或治療CTGF參與病態形成之各種疾病。

研究進行直至現在,作為對人類CTGF顯示抑制功能作用之抗體,揭示有人類單株抗體之M84及M320(專利文獻1)、CLN1(專利文獻2)或小鼠單株抗體之CTGF-m2-1(專利文獻3)等。其中,CLN1係被檢討的最詳細,於間質性肺纖維症模式或單側尿管結紮而腎間質纖維化模式中,顯示該效果。CLN1現在係以FG-3019於臨床試驗(第二期)階段。

然而,傳統的抗體對CTGF的結合活性稱不上充份,就治療有效性之觀點,對CTGF之中和活性稱不上很強。

一般,作為規定抗體醫藥之有效投與量之主要因素,可列舉抗體具有對抗原之結合活性或中和活性、或體內存在的抗原量,但使結合活性或中和活性提升係與投與量減低有關,作為結果可說是亦對減低患者經濟上的負擔或醫

療成本極為有效的改良。

由此可知，取得比傳統的抗體之結合活性或中和活性強之抗人類 CTGF 抗體，用以利用於預防或治療 CTGF 參與病態形成之各種疾病是不可或缺的。

先前技術文獻

專利文獻

〔專利文獻 1〕特開 2000-232884

〔專利文獻 2〕WO2004/108764

〔專利文獻 3〕WO2007/066823

非專利文獻

〔非專利文獻 1〕D.M. Bradham et al, J. Cell Biol. 114:1285-1294 (1991)

〔非專利文獻 2〕A. Igarashi et al, Mol. Biol. Cell 4:637-645 (1993)

〔非專利文獻 3〕Blom IE et al, Matrix Biol. 21 (6):473-82 (2002)

〔非專利文獻 4〕Abreu, et al. Nat. Cell. Biol. 4, 599-604 (2002)

〔非專利文獻 5〕Ito Y et al.: Kidney Int. 53 (4) 853-61, (1998)

〔非專利文獻 6〕Phanish MK et al, Nephron Exp Nephrol. 114 (3) e83-92; (2010)

〔非專利文獻 7〕Shi-Wen X et al, Cytokine Growth Factor Rev. 19 (2):133-44. (2008)

[非專利文獻 8] Jun JI et al, Nat Rev Drug Discov.
10 (12) :945-63 (2011)

【發明內容】

發明所欲解決之課題

本發明之課題係提供與傳統之抗人類 CTGF 抗體比較，結合活性及/或中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體。

課題之解決手段

本發明係包含適用於醫學上或產業上之物質、方法之後述發明者。

[1] 含序列號碼 10 所示之胺基酸序列而成之重鏈可變區、及序列號碼 4 所示之胺基酸序列而成之輕鏈可變區之抗人類 CTGF 抗體。

[2] 前述抗體之重鏈恆定區為人 Ig γ 1 恆定區之 [1] 之抗人類 CTGF 抗體。

[3] 前述抗體之輕鏈恆定區為人 Ig κ 恆定區之 [1] 之抗人類 CTGF 抗體。

[4] 前述抗體之重鏈恆定區為人 Ig γ 1 恆定區，前述抗體之輕鏈恆定區為人 Ig κ 恆定區之 [1] 之抗人類 CTGF 抗體。

[5] 含序列號碼 12 所示之胺基酸序列而成之重鏈、及序列號碼 8 所示之胺基酸序列而成之輕鏈之 [1] 之抗人類 CTGF 抗體。

〔 6 〕 含 編 碼 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 抗 體 之 重 鏈 可 變 區 之 序 列 之 聚 核 苷 酸 。

〔 7 〕 含 編 碼 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 抗 體 之 輕 鏈 可 變 區 之 序 列 之 聚 核 苷 酸 。

〔 8 〕 含 〔 6 〕 及 / 或 〔 7 〕 之 聚 核 苷 酸 之 表 現 載 體 。

〔 9 〕 以 〔 8 〕 之 表 現 載 體 所 轉 型 之 宿 主 細 胞 。

〔 10 〕 選 自 後 述 (a) 及 (b) 所 成 群 之 〔 9 〕 之 宿 主 細 胞 。

(a) 以 含 有 含 編 碼 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 抗 體 之 重 鏈 可 變 區 之 序 列 之 聚 核 苷 酸 與 含 編 碼 該 抗 體 之 輕 鏈 可 變 區 之 序 列 之 聚 核 苷 酸 之 表 現 載 體 所 轉 型 之 宿 主 細 胞 ； 及

(b) 以 含 有 含 編 碼 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 抗 體 之 重 鏈 可 變 區 之 序 列 之 聚 核 苷 酸 之 表 現 載 體 與 含 有 含 編 碼 該 抗 體 之 輕 鏈 可 變 區 之 序 列 之 聚 核 苷 酸 之 表 現 載 體 所 轉 型 之 宿 主 細 胞 。

〔 11 〕 包 含 培 養 〔 9 〕 或 〔 10 〕 之 宿 主 細 胞 ， 使 抗 人 類 CTGF 抗 體 表 現 之 步 驟 之 生 產 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 生 產 抗 人 類 CTGF 抗 體 之 方 法 。

〔 12 〕 含 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 抗 體 之 人 類 CTGF 參 與 病 態 形 成 之 各 種 疾 病 之 治 療 藥 。

〔 13 〕 前 述 疾 病 係 腎 病 之 〔 12 〕 之 治 療 藥 。

〔 14 〕 前 述 腎 病 係 慢 性 腎 臟 病 或 糖 尿 病 性 腎 病 之 〔 13 〕 之 治 療 藥 。

〔 15 〕 包 含 投 與 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 中 任 一 種 抗 體 之 步 驟 之

用以預防或處理人類 CTGF 參與病態形成之疾病之方法。

〔 16 〕 前述疾病係腎病之〔 15 〕之方法。

〔 17 〕 前述腎病係慢性腎臟病或糖尿病性腎病之〔 16 〕之方法。

〔 18 〕 用以使用於用以預防或處理人類 CTGF 參與病態形成之疾病之〔 1 〕～〔 5 〕中任一種抗體。

〔 19 〕 前述疾病係腎病之〔 18 〕之抗體。

〔 20 〕 前述腎病係慢性腎臟病或糖尿病性腎病之〔 19 〕之抗體。

發明之功效

依據本發明，提供與傳統之抗人類 CTGF 抗體比較，結合活性及/或中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體。本發明之抗人類 CTGF 抗體係藉由抑制人類 CTGF 機能，具有強力的抗纖維化作用者，有效地預防或治療人類 CTGF 參與病態形成之各種疾病。因此，如此的本發明之抗人類 CTGF 抗體係對投與量減低、擴大投與間隔、改善投與方法（例如皮下注射劑）等之臨床適用，帶來良好的改善，寄予大幅改善治療有效性及患者之遵從性。

用以實施發明之最佳型態

後述詳細地說明本發明。

本發明者等係於製作抗人類 CTGF 抗體，重複相當的創意檢討之結果，與傳統的抗人類 CTGF 抗體比較，改善

結合活性，成功地製作中和活性佳之抗人類 CTGF 抗體。

抗體分子之基本結構係各類共通地由分子量 5 萬～7 萬之重鏈與 2～3 萬之輕鏈所構成。重鏈通常係由約含 440 個胺基酸之聚胜肽鏈而成，各類具有特徵的結構，對應 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE，稱為 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 鏈。進而，IgG 存在 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，分別稱為 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 。輕鏈通常係由約含 220 個胺基酸之聚胜肽鏈而成，已知有 L 型及 K 型 2 種，分別稱為 λ 、 κ 鏈。抗體分子之基本結構之胜肽結構係分別相同的 2 股重鏈及 2 股輕鏈，由雙硫鏈（S-S 鍵）及非共價鏈所鍵結，分子量為 15 萬～19 萬。2 種輕鏈係可與任何重鏈成對。各個抗體分子經常由 2 股相同的輕鏈與 2 股相同的重鏈而成。

鏈內 S-S 鍵係重鏈有四個（ μ 、 ϵ 鏈有五個），輕鏈有二個，每胺基酸為 100～110 個之殘基形成一個圈，此立體結構係各圈間相似，稱為結構單位或區域。重鏈、輕鏈皆位於 N 端之區域係即使來自同種動物之同一類（副類）之標準品，其胺基酸序列並不一定，稱為可變區，各區域係分別稱為重鏈可變區（ V_H ）及輕鏈可變區（ V_L ）。據此 C 端側之胺基酸序列係各個分類或副類大致一定，稱為恆定區（各區域係分別表示為 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 或 C_L ）。

抗體的抗原決定部份係藉由 V_H 及 V_L 所構成，結合之特異性係依據此部份之胺基酸序列。另一方面，所謂的與

補體或各種細胞之結合之生物學活性係反映於各類 Ig 之恆定區之結構差異。已知輕鏈及重鏈之可變區之可變性係大致局限於任一種鏈皆存在之 3 個小的超可變區，稱此等區域為互補性決定區（CDR；自 N 端側分別為 CDR1、CDR2、CDR3）。可變區剩餘的部份係稱為骨架區（FR），係比較恆定的。

本發明者等成功地製作本發明之抗人類 CTGF 抗體係具有後述特徵之抗人類 CTGF 抗體。

含序列號碼 10 所示之胺基酸序列而成之重鏈可變區、及序列號碼 4 所示之胺基酸序列而成之輕鏈可變區之抗人類 CTGF 抗體。

具體上，本發明者等係使用人類單株抗體開發技術「VelocImmune」（VelocImmune antibody technology; Regeneron 社（美國專利 6596541 號））小鼠，製作抗體，藉由使用各種生物學的活性試驗及物性試驗之抗體篩選，成功地鑑定本發明之抗人類 CTGF 抗體。VelocImmune 技術係將內因性之免疫球蛋白重鏈及輕鏈之可變區為對應之人類可變區所取代之基因重組小鼠，以目的抗原（例如人類 CTGF）進行免疫後，取得表現抗體之小鼠之淋巴系細胞，藉由與小鼠之骨髓瘤細胞進行細胞融合，製作融合瘤。接著，將此融合瘤細胞，對於是否產生特異性地結合於目的抗原之抗體，進行篩選。在此所產生的抗體係具有人類抗體之可變區與小鼠抗體之恆定區之抗體（亦稱為複合抗體）。接著，鑑定特異性地結合於目的

抗原之抗體時，自其融合瘤細胞單離編碼抗體之重鏈及輕鏈之可變區之 DNA，將該 DNA 連結於編碼所需類別之人類抗體重鏈及輕鏈之恆定區之 DNA。使如此所得之編碼重鏈及輕鏈之基因於細胞內（例如 CHO 細胞）表現，產生抗體分子。依該方法所製作之抗體之重鏈及輕鏈係來自人類免疫球蛋白基因之「完全人類型」抗體之重鏈及輕鏈。

本發明之抗人類 CTGF 抗體係基於本申請說明書所揭示之其重鏈可變區及輕鏈可變區之序列訊息，使用該領域已知方法，藉由該業者而可容易製作。適宜的是本發明之抗人類 CTGF 抗體係將其重鏈可變區及輕鏈可變區，分別連結於人類抗體之重鏈恆定區及輕鏈恆定區，可製作完全人類型抗體。具體上，製作具有編碼本發明之抗體之重鏈可變區胺基酸（序列號碼 10）之鹽基序列之重鏈可變區基因片段、及具有編碼本發明之抗體之輕鏈可變區胺基酸（序列號碼 4）之鹽基序列之輕鏈可變區基因片段。接著，使此可變區基因與人類抗體之適當類之恆定區基因連結，製作完全人類型抗體基因。接著，連結此抗體基因於適當之表現載體，導入培養細胞中。最後，培養此培養細胞，自培養上澄液，可得到單株抗體。

編碼本發明之抗體之重鏈可變區及輕鏈可變區之胺基酸之基因片段係例如基於依據該重鏈及輕鏈可變區之胺基酸序列所設計之鹽基序列，利用該領域已知之基因合成方法而可合成。作為如此基因合成方法，可使用 WO90/07861 記載之抗體基因之合成方法等之該基者已知

之各種方法。

接著，使前述之可變區基因片段及人類抗體之恆定區基因連結，製作完全人類型抗體基因。所使用之人類抗體之恆定區，雖亦可選擇任何之副類恆定區（例如作為重鏈之 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 或 $\gamma 4$ ，作為輕鏈之 λ 或 κ 鏈之恆定區），但可用作為重鏈恆定區之人 Ig $\gamma 1$ ，以及作為輕鏈恆定區之人 Ig κ 為宜。

製作此完全人類型抗體基因後，接著關於導入抗體基因於表現載體、導入表現載體於培養細胞、培養培養細胞、精製抗體等，可使用該領域已知之各種方法進行。

作為如前述所得之與抗體基因所連結之表現載體，可舉例如 GS 載體 pEE6.4 或 pEE12.4（Lonza Biologics 社），但只要可表現抗體基因者即可，並無特別限制。另外，亦可使用 AG- $\gamma 1$ 或 AG- κ （例如參考 WO94/20632）等之預先具有人 Ig 恆定區基因者。

前述之表現載體係藉由例如磷酸鈣法、電穿孔法等，導入於培養細胞中。

作為導入表現載體之培養細胞，例如可使用 CHO-K1SV 細胞、CHO-DG44 細胞、293 細胞等之培養細胞，將其藉由常法培養即可。

前述培養後，培養上澄液中所累積之抗體係可藉由各種管柱層析法，例如使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱之各種層析法精製。

本發明之抗人類 CTGF 抗體係結合於人類 CTGF 的抗

體。作為測定所得之抗人類 CTGF 抗體對人類 CTGF 之結合活性之方法，有 ELISA 或表面電漿共振（SPR）分析等之方法。例如，使用 ELISA 時，固定人類 CTGF（序列號碼 14）於 ELISA 盤，對此添加抗人類 CTGF 抗體，使反應後，使以辣根過氧化酶（HRP）等之酵素標記之抗 IgG 抗體等之二次抗體反應，洗淨後，加入發色基質（例如 HRP 標記時，TMB 發色試劑），測定吸光度。另外，使用 SPR 分析，可更詳細地測定對人類 CTGF 之結合活性。進行 SPR 分析時，例如藉由使用 Biacore 系統，測定抗人類 CTGF 抗體與人類 CTGF 之結合速度常數（ k_a ）及解離速度常數（ k_d ），由 2 個常數的比，可算出解離常數（ K_D ）。本發明之抗人類 CTGF 抗體亦包含結合於來自其他動物之 CTGF（例如小鼠 CTGF）的抗體，亦可測定對此等蛋白質之結合活性。

另外，本發明之抗人類 CTGF 抗體係具有對人類 CTGF 之中和活性。本說明書中使用時，所謂抗體之「中和活性」係指抑制因對 CTGF 之結合而介在 CTGF 所帶來之任意的生物活性之活性，可評估 CTGF 之 1 種或多數生物活性為指標。作為如此中和活性，可舉例如來自腎臟之纖維母細胞之抑制膠原蛋白合成（抑制纖維化）作用，可藉由使用如後述實施例所記載之方法而評估。

為更詳細地評估本發明之抗人類 CTGF 抗體之效果，亦可使用抗體之 *in vivo* 之藥效試驗。例如藉由如後述實施例所記載之使用小鼠慢性腎臟病模式或大鼠慢性腎炎模

式之腎機能評估，可評估抗體於 *in vivo* 之藥效。

其他，作為評估本發明之抗人類 CTGF 抗體之各種安定性（例如熱安定性、長期保存安定性、高濃度安定性）之方法，可舉例如利用示差掃描熱量測定或保存中凝聚體形成之測定之方法。

適宜的是本發明之抗人類 CTGF 抗體係使用該領域已知之方法，合成含編碼序列號碼 10 所示之重鏈可變區之胺基酸序列之鹽基序列之 DNA、及合成含編碼序列號碼 4 所示之輕鏈可變區之胺基酸序列之鹽基序列之 DNA，將此等與適當類別之人類抗體恆定區基因，適宜的是對於重鏈係人 Ig γ 1 恆定區基因，對於輕鏈係人 Ig κ 恆定區基因連結，建構完全人類型抗體基因，使用該領域已知之各種方法，藉由導入該完全人類型抗體基因於表現載體，導入該表現載體於培養細胞，培養該培養細胞，自所得之培養物精製抗體，可容易取得。含編碼序列號碼 10 所示之重鏈可變區胺基酸序列之鹽基序列之 DNA 係包含序列號碼 9 所示之鹽基序列為宜。含編碼序列號碼 4 所示之輕鏈可變區胺基酸序列之鹽基序列之 DNA 係包含序列號碼 3 所示之鹽基序列為宜。

含序列號碼 10 所示之重鏈可變區及人 Ig γ 1 恆定區之本發明適合的抗人類 CTGF 抗體重鏈係由序列號碼 12 所示之胺基酸序列而成之重鏈。含序列號碼 4 所示之輕鏈可變區及人 Ig κ 恆定區之本發明適合的抗人類 CTGF 抗體輕鏈係由序列號碼 8 所示之胺基酸序列而成之輕鏈。含編

碼由序列號碼 12 所示之胺基酸序列而成之抗人類 CTGF 抗體重鏈之鹽基序列之 DNA 係包含序列號碼 11 所示之鹽基序列為宜。含編碼由序列號碼 8 所示之胺基酸序列而成之抗人類 CTGF 抗體輕鏈之鹽基序列之 DNA 係包含序列號碼 7 所示之鹽基序列為宜。作為含由序列號碼 12 所示之胺基酸序列而成之重鏈與由序列號碼 8 所示之胺基酸序列而成之輕鏈之本發明之抗人類 CTGF 抗體，可列舉後述實施例所記載之完全人類型 37-45-MH1。

本發明亦包含含有含由序列號碼 10 之第 31~35 之胺基酸序列而成之 CDR1、由序列號碼 10 之第 50~66 之胺基酸序列而成之 CDR2、由序列號碼 10 之第 99~108 之胺基酸序列而成之 CDR3 之重鏈可變區，以及含由序列號碼 4 之第 24~35 之胺基酸序列而成之 CDR1、由序列號碼 4 之第 51~57 之胺基酸序列而成之 CDR2、由序列號碼 4 之第 90~98 之胺基酸序列而成之 CDR3 之輕鏈可變區之抗人類 CTGF 抗體。如此之抗人類 CTGF 抗體亦又依據如前述之步驟，該業者可容易製作。

本發明亦包含含本發明之抗體之重鏈可變區及輕鏈可變區，保持活性之單股可變區片段（scFv）、Fab、Fab'、F(ab')₂ 等之抗人類 CTGF 抗體片段。另外，若為該業者，基於本發明，亦可製作該抗人類 CTGF 抗體或抗體片段與其他胜肽或蛋白質之融合抗體、或製作使結合修飾劑之修飾抗體。融合所使用之其他胜肽或蛋白質係只要不使抗體之結合活性降低者，並無特別限定，可舉例如人類白

清白蛋白、各種 tag 胜肽、人工螺旋模體胜肽、結合麥芽糖之蛋白質、穀胱甘肽硫轉移酶、各種毒素、其他可促進多量體化之胜肽或蛋白質等。修飾所使用之修飾劑係只要不使抗體之結合活性降低者，並無特別限定，可舉例如聚乙二醇、糖類、磷脂質、微脂粒、低分子化合物等。

如此所得之本發明之抗人類 CTGF 抗體係因應需要，更進一步精製後，依據常法所製劑化，可使用於預防、治療慢性腎臟病、糖尿病性腎病等之腎病、血管增殖性疾病、心肌症、肝臟纖維增殖病、肺纖維病、皮膚纖維化疾病、糖尿病性網膜症、癌等之 CTGF 參與病態形成之各種疾病。

本發明之抗人類 CTGF 抗體係可作為腎病治療劑為宜，以慢性腎臟病或糖尿病性腎病之治療劑尤佳。作為此等治療劑等之劑型例，可為注射劑、點滴用劑等之非經口劑，以藉由靜脈內投與、皮下投與等投與為宜。另外，關於製劑化，於藥學上所容許之範圍，可使用因應此等劑型之載體或添加劑。

關於前述製劑化之本發明之抗人類 CTGF 抗體之添加量雖依患者症狀之程度或年齡、使用製劑之劑型、或抗體之結合力價而異，但使用例如 0.001mg/kg 至 100mg/kg 程度為宜。

本發明又提供含編碼本發明之抗人類 CTGF 抗體之序列之聚核苷酸及含其之表現載體。本發明又提供含編碼本發明之抗人類 CTGF 抗體之重鏈可變區之序列之聚核苷

酸、及含編碼本發明之抗 CTGF 抗體之輕鏈可變區之序列之聚核苷酸、以及含此等中任一種或二者之表現載體。本發明之表現載體係於原核細胞及/或真核細胞之各種宿主細胞中，表現編碼本發明之抗體或其重鏈可變區及/或輕鏈可變區之基因，只要可產生此等多胜肽者即可，並無特別限定。可舉例如質體載體、病毒載體（例如腺病毒、反轉錄病毒）等。適宜的是本發明之表現載體係含有含編碼前述之本發明之抗體之重鏈或輕鏈之序列之聚核苷酸，或含有含編碼本發明之抗體之重鏈之序列之聚核苷酸與含編碼本發明之抗體之輕鏈之序列之聚核苷酸二者。

本發明之表現載體可含有對編碼本發明之抗人類 CTGF 抗體或其重鏈可變區及/或輕鏈可變區之基因，可機能性連結之啓動子。作為細菌中使編碼本發明之抗體或其重鏈可變區及/或輕鏈可變區之基因表現用之啓動子，宿主為大腸桿菌屬菌時，可舉例如 Trp 啓動子、lac 啓動子、recA 啓動子、 λ PL 啓動子、lpp 啓動子、tac 啓動子等。作為酵母中之表現用啓動子，可舉例如 PH05 啓動子、PGK 啓動子、GAP 啓動子、ADH 啓動子，作為芽孢桿菌屬菌之表現用啓動子，可舉例如 SL01 啓動子、SP02 啓動子、penP 啓動子等。另外，宿主為哺乳動物細胞等之真核細胞時，可舉例如來自 SV40 之啓動子、反轉錄病毒之啓動子、熱休克蛋白啓動子等。

使用細菌，尤其大腸菌作為宿主細胞時，本發明之表現載體進一步可含開始密碼、終止密碼、終止子

(terminator) 區及可複製單位。另一方面，使用酵母、動物細胞或昆蟲細胞作為宿主時，本發明之表現載體係可含開始密碼、終止密碼。另外，此時可含有增強子序列、編碼本發明之抗體或其重鏈可變區或輕鏈可變區之基因之5'端及3'端之非轉譯區域、分泌訊號序列、剪接位、多聚腺苷酸化點、或可複製單位等。另外，因應目的，亦可含通常所使用之篩選標記（例如四環黴素抗性基因、安比西林抗性基因、卡納黴素抗性基因、新黴素抗性基因、二氫葉酸還原酶基因）。

本發明又提供導入編碼本發明之抗體或其重鏈可變區及/或輕鏈可變區之基因之轉型株。如此之轉型株係可藉由例如以本發明之表現載體將宿主細胞轉型而製作。作為製作轉型株所使用之宿主細胞，只要適合前述之表現載體，可被轉型者即可，並無特別限定，例如本發明之技術領域中通常所使用之天然細胞或人工所建立的細胞等之各種細胞（例如細菌（大腸桿菌屬菌、芽孢桿菌屬菌）、酵母（酵母菌屬（*Saccharomyces*）、畢赤酵母屬等）、動物細胞或昆蟲細胞（例如 Sf9 等））。轉型係可藉由本身已知之方法進行。

適宜的是本發明之轉型株係以含有含編碼本發明之抗體之重鏈可變區之序列之聚核苷酸與含編碼本發明之抗體之輕鏈可變區之序列之聚核苷酸之表現載體所轉型之宿主細胞，或以含有含編碼本發明之抗體之重鏈可變區之序列之聚核苷酸之表現載體與含有含編碼本發明之抗體之輕鏈

可變區之序列之聚核苷酸之表現載體所轉型之宿主細胞。更適宜的是本發明之轉型株係以前述之含有含編碼本發明之抗體之重鏈之序列之聚核苷酸與含編碼本發明之抗體之輕鏈之序列之聚核苷酸之表現載體所轉型之宿主細胞，或以前述之含有含編碼本發明之抗體之重鏈之序列之聚核苷酸之表現載體與含有含編碼本發明之抗體之輕鏈之序列之聚核苷酸之表現載體所轉型之宿主細胞。

本發明又提供包含使編碼本發明之抗體或其重鏈可變區及/或輕鏈可變區之基因於宿主細胞表現，亦即使用如此之轉型株之本發明之抗人類 CTGF 抗體之生產方法。適宜的是於該方法所使用之宿主細胞係前述之以本發明之表現載體所轉型之宿主細胞，該表現載體係可分別或同時含有含編碼本發明之抗體之重鏈可變區之序列之聚核苷酸與含編碼本發明之抗體之輕鏈可變區之序列之聚核苷酸。

本發明之抗人類 CTGF 抗體之生產中，轉型株係可於營養培養基中所培養。營養培養基係以含有轉型株生長發育所需之碳源、無機氮源或有機氮源為宜。作為碳源，例如葡萄糖、糊精、可溶性澱粉、蔗糖等，作為無機氮源或有機氮源，可舉例如銨鹽類、硝酸鹽類、胺基酸、玉米浸漬液（Corn steep liquor）、蛋白腴、酪蛋白、肉萃取物、大豆粕、馬鈴薯萃取液等。另外，依據所需，可含有其他營養素（例如無機鹽（例如氯化鈣、磷酸二氫鈉、氯化鎂）、維生素類、抗生物（例如四環黴素、新黴素、安比西林、卡納黴素等）等）。

轉型株之培養係藉由本身已知之方法所進行。培養條件，例如溫度、培養基之 pH 及培養時間係可適當選擇。例如宿主為動物細胞時，作為培養基，可使用含約 5～20% 之胎兒牛血清之 MEM 培養基（Science, Vol.122, p.501, 1952）、DMEM 培養基（Virology, Vol.8, p.396, 1959）、RPMI1640 培養基（J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p.519, 1967）、199 培養基（proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p.1, 1950）等。培養基之 pH 係以約 6～8 為宜，培養通常係於約 30～40℃，進行約 15～72 小時，因應需要，亦可進行通氣或攪拌。宿主係昆蟲細胞時，可舉例如含胎兒牛血清之 Grace's 培養基（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985）等，其 pH 係以約 5～8 為宜。培養通常係於約 20～40℃，進行約 15～100 小時，因應需要，亦可進行通氣或攪拌。宿主為細菌、放射線菌、酵母、絲狀菌時，例如含有前述營養源之液體培養基係適當的。適合的是 pH5～8 之培養基。宿主為 E.coli 時，作為適合的培養基，可列舉 LB 培養基、M9 培養基（Miller 等，Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972）等。操作時，培養係因應需要，於通氣、攪拌下，通常 14～43℃，可進行約 3～24 小時。宿主為芽孢桿菌屬菌時，因應需要，於通氣、攪拌下，通常 30～40℃，可進行約 16～96 小時。宿主為酵母時，作為培養基，可舉例如 Burkholder 最小培養基（Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980），pH

係以 5～8 爲宜。培養通常係於約 20～35℃，進行約 14～144 小時，因應需要，亦可進行通氣或攪拌。

本發明之抗人類 CTGF 抗體係培養如前述之轉型株，可自該轉型株回收，以單離、精製爲宜。作爲單離、精製方法，可舉例如鹽析、溶劑沈澱法等之利用溶解度之方法、透析、超濾、凝膠過濾、十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳等之利用分子量差異之方法、離子交換層析或氫氧基磷灰石層析等之利用電荷之方法、親和層析等之利用特異的親和性之方法、逆相高效液相層析法等之利用疏水性差異之方法、等電點電泳等之利用等電點差異之方法等。

整體地記載關於本發明，進一步爲取得理解，在此提供參考之特定實施例，但此等爲舉例的目的，本發明並非受限定者。

【實施方式】

實施例

關於使用市售的試劑組或試藥等之部份，除非特例，皆依添附的協定進行實驗。

（實施例 1：取得各種來源之 CTGF 蛋白質）

本發明者等，取得人類 CTGF 蛋白質作爲用以製作抗人類 CTGF 抗體之抗原。將人類 CTGF 之全長基因（序列號碼 13）嵌入表現載體（pcDNA3.1；Invitrogen 社），將

製作的載體，使用基因導入試劑之 FreeStyle MAX Reagent (Invitrogen 社)，導入基因於 FreeStyle 293 細胞 (Invitrogen 社)。將此細胞，以使用 FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen 社) 之無血清培養系培養後，取得含人類 CTGF 蛋白質之培養上澄液。自取得之培養上澄液，使用 HiTrap 肝素管柱及 CM 管柱 (GE Healthcare Japan 社) 精製蛋白質，使用於下述實驗。關於小鼠、大鼠及猴子 CTGF 蛋白質，亦使用相同方法取得。

(實施例 2：對 VelocImmune 小鼠之免疫)

藉由對 VelocImmune 小鼠之免疫而取得對人類 CTGF 之抗體。本發明者等為提高所得抗體之多樣化，檢討複數的免疫方法、投與途徑、佐劑、免疫期間等。作為免疫原係使用精製之人類 CTGF，與佐劑混合後，進行免疫。作為投與途徑，檢討腳趾投與與腹腔投與。作為佐劑，檢討 TiterMax Gold (CytRx Corporation)、佛朗氏完全佐劑 (Sigma 社) 及佛朗氏不完全佐劑 (Sigma 社)。進而，作為添加之免疫賦活劑，檢討 CpG 寡核苷酸及 Aluminum Phosphate Gel (BRENNTAG 社)。作為免疫期間，檢討 3 週～14 週。數次免疫後，由小鼠尾靜脈進行採血，偵測力價，進行產生結合於人類 CTGF 之抗體之 VelocImmune 小鼠選擇。

力價測定係使用後述標準的 ELISA 方法進行測定。於

Maxisorp384 盤 (Nunc 社)，添加 $20\mu\text{l}$ 之人類 CTGF 磷酸緩衝生理食鹽水 (PBS) ($1\mu\text{g/ml}$)，於 4°C 培養一晚而固體化。隔天，將盤以 $100\mu\text{l}$ 之洗淨液 (TBST: 含有 0.05% Tween-20 之 Tris-buffer) 洗淨一次後，添加 $100\mu\text{l}$ 之阻斷劑 (含有 1% BSA 之 PBS)，於室溫靜置 1 小時。以 $100\mu\text{l}$ 之 TBST 洗淨液洗淨一次後，製作採血之血漿之稀釋系列而添加。於室溫培養 1 小時後，以 $100\mu\text{l}$ 之 TBST 洗淨液洗淨三次，添加 $20\mu\text{l}$ 之以含有 0.1% BSA 之 TBST 洗淨液稀釋成 5000 倍之辣根過氧化酶標記山羊抗小鼠 IgG 抗體 (HRP-goat anti-mouse IgG antibody; Zymed 社)。於室溫下培養 1 小時後，以 $100\mu\text{l}$ 之 TBST 洗淨液洗淨三次。加入 $40\mu\text{l}$ 之 TMB 發色試劑 (住友 bakelite 社)，於室溫下靜置 10 分鐘後，加入 $40\mu\text{l}$ 之停止液 (2mol/l 硫酸)，使反應停止，測定 450nm 之吸光度。

(實施例 3：製作產生抗人類 CTGF 抗體之融合瘤)

對確認抗體上升而選擇之小鼠，進行最終免疫 (抗原之靜脈內投與或腹腔內投與)。依據規定方法，取出經免疫之小鼠脾臟或淋巴節等，收集淋巴球，將此與小鼠骨髓瘤細胞 SP2/0 進行細胞融合，製作融合瘤。將融合瘤極限稀釋，形成單一選殖體，並自上澄液，使用蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱 (GE Healthcare Japan 社) 精製抗體。

(實施例 4：ELISA 分析)

本發明者等係使用 ELISA 方法，評估抗體對 CTGF 之結合特異性。於 Maxisorp384 盤（Nunc 社），添加 $20\ \mu\text{l}$ 之人類 CTGF 之 PBS 溶液（ $1\ \mu\text{g/ml}$ ），於 4°C 培養一晚而固體化。隔天，將盤以 $100\ \mu\text{l}$ 之洗淨液（TPBS：含有 0.05% Tween-20 之 PBS）洗淨一次後，添加 $100\ \mu\text{l}$ 之阻斷劑（含有 1% BSA 之 PBS），於室溫靜置 1 小時。以 $100\ \mu\text{l}$ 之 TBST 洗淨液洗淨一次後，將精製抗體樣品，製作適當的稀釋系列而添加。於室溫培養 1 小時後，以 $100\ \mu\text{l}$ 之 TBST 洗淨液洗淨三次，添加 $20\ \mu\text{l}$ 之以含有 0.1% BSA 之 TBST 洗淨液稀釋成 5000 倍之辣根過氧化酶標記山羊抗小鼠 IgG 抗體（HRP-goat anti-mouse IgG antibody；Zymed 社）。於室溫下培養 1 個小時後，以 $100\ \mu\text{l}$ 之 TBST 洗淨液洗淨三次。加入 $40\ \mu\text{l}$ 之 TMB 發色試劑（住友 bakelite 社），於室溫下靜置 10 分鐘後，加入 $40\ \mu\text{l}$ 之停止液（ 2mol/l 硫酸），使反應停止，測定 450nm 之吸光度。對各抗體以複製（duplicate）進行試驗，藉由符合曲線分析 EC_{50} 。

此結果係確認命名為 37-45 之抗體，具有高結合活性（ EC_{50} ： 1.6ng/ml ）。

（實施例 5：抗體之序列決定）

對於所鑑定之抗體 37-45，本發明者等自融合瘤選殖編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因。自融合瘤萃取 RNA，使用 cDNA 增幅試劑組（SMARTer RACE cDNA Amplification

kit; Clontech 社)，製作 cDNA。接著，使用 PCR，延長及增幅重鏈及輕鏈之可變區。將 PCR 產物，對 pCR3.1-TOPO (Invitrogen 社) 等之 PCR 產物次選殖 (Subcloning) 用載體進行重組後，使用定序儀 (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems 社)，決定基因序列。

分別表示，所決定之 37-45 之重鏈可變區之鹽基序列為序列號碼 1，胺基酸序列為序列號碼 2，37-45 之輕鏈可變區之鹽基序列為序列號碼 3，胺基酸序列為序列號碼 4。

(實施例 6：製作完全人類型抗體)

前述抗體係可變區來自人類，恆定區來自小鼠的抗體。因此，本發明者等係將來自小鼠的恆定區，取代成來自人類之恆定區，製作完全人類型抗體 (完全人類型 37-45)。具體上，分別於抗體之重鏈可變區基因之 5'端，連接訊號序列，接著 3'端連接人 Ig γ 1 之恆定區基因 (Man Sung Co 等，(1992) J Immunol. Vol. 148 (4) : 1149-1154)，插入此重鏈基因於 GS 載體 (Lonza Biologics 社) pEE6.4。插入時，將基因中之限制酵素 BbvCI 識別位點，改變成不對抗體胺基酸序列造成影響之 DNA 序列。另外，分別於抗體之輕鏈可變區基因之 5'端，連接訊號序列，接著 3'端連接人 κ 鏈之恆定區基因 (Man Sung Co 等，前出)，插入此輕鏈基因於 GS 載體 pEE12.4。

分別表示製作之完全人類型 37-45 之重鏈之鹽基序列

為序列號碼 5，胺基酸序列為序列號碼 6，該抗體之輕鏈之鹽基序列為序列號碼 7，胺基酸序列為序列號碼 8。

（實施例 7：製作可變區之糖鏈修飾部位之突變株）

前述之完全人類型 37-45 之重鏈可變區胺基酸係包含於 N-X-(T/S) 之 N 型糖鏈修飾模體 (motif) 序列。具體上，序列號碼 2 所示之重鏈可變區中，依據 Kabat 編號，第 58 個 Asn 符合糖鏈修飾部位。已知糖鏈修飾部位存在時，細胞培養間發生糖鏈附加於抗體，但糖鏈附加係依賴培養條件或使表現之宿主。亦即，即使建立相同的抗體產生細胞，仍有依培養條件（培養基、細胞密度等）而糖鏈附加程度改變之可能性，有難以取得均勻品質之抗體醫藥品之可能性。因此，本發明者等係製作於完全人類型 37-45 之重鏈可變區，導入突變之完全人類型抗體（完全人類型 37-45-MH1）。

分別表示製作之完全人類型 37-45-MH1 之重鏈可變區之鹽基序列為序列號碼 9，胺基酸序列為序列號碼 10。分別表示製作之完全人類型 37-45-MH1 之重鏈之鹽基序列為序列號碼 11，胺基酸序列為序列號碼 12。完全人類型 37-45-MH1 之輕鏈係與完全人類型 37-45 之輕鏈相同。

完全人類型 37-45-MH1 抗體之重鏈可變區之 CDR1、CDR2 及 CDR3 係分別依據 Kabat 編號之重鏈可變區之第 31~35、第 50~65 及第 95~102 區域，分別由序列號碼 10 之第 31~35、第 50~66 及第 99~108 胺基酸序列而

成。完全人類型 37-45-MH1 抗體之輕鏈可變區之 CDR1、CDR2 及 CDR3 係分別依據 Kabat 編號之輕鏈可變區之第 24~34、第 50~56 及第 89~97 區域，分別由序列號碼 4 之第 24~35、第 51~57 及第 90~98 胺基酸序列而成。

（實施例 8：完全人類型抗體之發現及精製）

將分別插入前述各抗體（完全人類型 37-45 及完全人類型 37-45-MH1）之重鏈與輕鏈之基因之前述 GS 載體，於 Not I 及 Pvu I，以限制酵素切斷，使用 Ligation-Convenience Kit（NIPPONGENE 社）或 Ligation-high（TOYOBO 社），進行接合（ligation），建構插入重鏈與輕鏈之兩基因之 GS 載體。此載體係編碼全長之重鏈及輕鏈與麩胺酸合成酵素（Glutamine synthetase），藉由轉殖（Transfection）於 CHO-K1SV 細胞，使抗體表現。將培養上澄液，以蛋白質 A 或蛋白質 G 管柱（GE Healthcare Japan 社）精製，得到各完全人類型抗體之精製抗體。

（實施例 9：完全人類型抗體之 ELISA 分析）

本發明者等係使用 ELISA 方法，評估前述實施例製作之完全人類型 37-45 及完全人類型 37-45-MH1 之對人、小鼠、大鼠及猴子 CTGF 之結合特異性。在此，雖使用與實施例 4 記載之方法相同的方法，但作為二次抗體係使用以含有 0.1% BSA 之 TBST 洗淨液稀釋成 5000 倍之辣根過氧

化酶標記兔子抗人 IgG 抗體（HRP-rabbit anti-human IgG antibody；DAKO 社）。對各抗體以複製（duplicate）進行試驗，藉由符合曲線分析 EC50。

其結果，可知任一種完全人類型抗體，對人、小鼠、大鼠及猴子 CTGF 具有相同程度之結合能力。

表 1： 完全人類型抗體對各種 CTGF 之結合活性
〔 表 1 〕

	完全人類型 37-45 EC50(ng/ml)	完全人類型 37-45-MH1 EC50(ng/ml)
人類 CTGF	13.2	10.4
小鼠 CTGF	12.4	9.2
大鼠 CTGF	13.1	9.2
猴子 CTGF	12.5	8.6

（實施例 10：藉由 SPR 分析，評估結合活性）

本發明者等為更詳細地測定完全人類型 37-45-MH1 之抗原特異之結合活性，進行表面電漿共振（SPR）分析。本實施例係使用抗人類 CTGF 抗體 CLN1（專利文獻 2）作為比較抗體。

於 SPR 分析中，使用 Biacore2000（GE Healthcare Japan 社），進行分析。於 Sensor Chip CM5 之表面，使用 Human Antibody Capture Kit 及 Amine Coupling Kit（GE Healthcare Japan 社），將抗 CTGF 抗體固體化。將實施例 1 取得之人類 CTGF，以 HBS-EP 溶液（GE Healthcare Japan 社）梯度稀釋，以流速 50 μ l/分，添加 100 μ l 於流動通路。藉由此測定系統，使用數據分析軟體

(BIA Evaluation) ， 計 算 人 類 CTGF 蛋 白 質 與 抗 CTGF 抗 體 之 結 合 速 度 常 數 (k_a) 、 解 離 速 度 常 數 (k_d) 及 解 離 常 數 (KD) 。

表 2： 藉由 SPR 分析，完全人類型 37-45-MH1 對人類 CTGF 之結合活性
[表 2]

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

此 結 果 係 確 認 完 全 人 類 型 37-45-MH1 與 抗 體 CLN1 之 活 性 比 較 ， 具 有 約 12 倍 高 之 對 人 類 CTGF 之 結 合 活 性 。

(實 施 例 11： 來 自 大 鼠 腎 細 胞 中 膠 原 蛋 白 合 成 之 抑 制 作 用)

本 發 明 者 等 為 測 定 完 全 人 類 型 37-45-MH1 之 抗 原 特 異 之 中 和 活 性 ， 檢 討 對 大 鼠 纖 維 母 細 胞 NRK-49F 中 $TGF\beta$ 誘 發 性 之 膠 原 蛋 白 合 成 之 抑 制 效 果 。 本 實 施 例 係 使 用 CLN1 作 為 比 較 抗 體 。

NRK-49F 細 胞 (自 ATCC 取 得) 係 藉 由 添 加 $TGF\beta$ 而 產 生 CTGF。 將 NRK-49F 細 胞 ， 接 種 於 含 有 10%FCS 之 DMEM 培 養 基 之 24 孔 培 養 盤 (5×10^4 細 胞) ， 24 小 時 後 ， 改 變 成 含 有 0.01%FCS 之 DMEM ($500\mu l$) 。 進 一 步 於 24 小 時 後 ， 加 入 $TGF\beta$ (R&D Systems ; $1ng/ml$) 於 培 養 基 。 於 添 加 $TGF\beta$ 1 小 時 前 ， 添 加 抗 人 類 CTGF 抗 體 (完 全 人 類 型 37-45-MH1 或 CLN1) ($1\mu g/ml$ 、 $3\mu g/ml$ 、

10 μ g/ml 之 3 組)。72 小時後，回收上澄液，進行 SDS-PAGE，使用 Anti-Collagen I antibody (Abcam 社)，依據常法，進行西方墨點法 (Western blotting) 分析。其結果係確認完全人類型 37-45-MH1 為濃度依賴的，與 CLN1 比較，具有強的膠原蛋白合成抑制能力。

(實施例 12：小鼠殘存腎臟模式之腎機能評估試驗)

腎絲球體硬化或尿細管變性係於引起慢性腎臟病之各種腎障礙共同呈現所見。此慢性腎臟病係可以呈現持續惡化性腎障礙之小鼠殘存腎臟模式進行檢討。此模式係藉由取出 2/3 個單側腎與全部取出另一側腎 (取出 5/6 個腎)，對腎施以負擔，誘發明顯的蛋白質尿及腎機能降低，病理組織學上顯示腎絲球體硬化或尿細管變性，顯示輕度間質纖維化 (參考例如 *Kidney International*, 64, 350-355, 2003)。

取出 5/6 腎係參考 Zhang 等之方法 (*Kidney International*, 56, 549-558, 1999) 而進行。9 週齡之雄性小鼠 ICR (日本 SLC, 靜岡縣濱松市)，腹腔內投與戊巴比妥 (50mg/kg)，進行麻醉，切除左腎頭側 1/3 個及尾側 1/3 個。自最初的手術 1 週後，腹腔內投與戊巴比妥 (50mg/kg)，進行麻醉，完全取出右側腎臟，完成取出 5/6 個腎。

取出 5/6 個腎後，於 1 週後進行取尿及抽血，測定尿中蛋白質排泄率及腎機能參數 (血中肌酸酐濃度及肌酸酐清除率)。蛋白質濃度測定係以 Bradford 法進行 (Bio-

Rad Laboratories)。肌酸酐濃度係使用 CRE-EN KAINOS (KAINOS 社) 測定。尿中蛋白質排泄率係以尿中肌酸酐濃度 (mg/dl) 修正尿中蛋白質濃度 (mg/ml) 而算出。以此等尿中蛋白質排泄率、血中肌酸酐濃度及肌酸酐清除率為指標，分組成溶劑處理組 (投與 pH7.4 之磷酸緩衝溶液) 或抗體投與組 (1 組 15 例)。投與抗體用量係設定 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 三組，開始試驗。磷酸緩衝溶液或完全人類型 37-45-MH1 係每週 1 次，於背部進行皮下注射 (合計投與 6 次)。試驗開始時、自試驗開始第 4 週及第 6 週，採取尿樣品及血液樣品，測定尿中蛋白質排泄率、血中肌酸酐濃度及肌酸酐清除率。

關於尿中蛋白質排泄率，於試驗開始之時間點，溶劑處理組與正常組比較，尿中蛋白質排泄率增加 (正常組為 5.1 ± 0.4 ；溶劑處理組為 9.7 ± 0.7 ($P < 0.01$))。自試驗開始第 4 週及第 6 週，溶劑處理組與正常組比較，尿中蛋白質排泄率增加。相對於此，抗體投與組 (1mg/kg 組及 2mg/kg 組)，統計學上無有意義差，但與溶劑處理組比較，依賴投與量地尿中蛋白質排泄率減少。

關於血中肌酸酐濃度，於試驗開始之時間點，溶劑處理組與正常組比較，血中肌酸酐濃度上升 (正常組為 0.36 ± 0.013 mg/dl；溶劑處理組為 0.53 ± 0.016 mg/dl ($P < 0.01$))。之後，於第 4 週、第 6 週，溶劑處理組與正常組比較，血中肌酸酐濃度上升 (第 4 週：正常組為 0.42 ± 0.025 mg/dl；溶劑處理組為 0.66 ± 0.037 mg/dl ($P <$

0.01) , 第 6 週 : 正常組為 $0.31 \pm 0.016 \text{ mg/dl}$; 溶劑處理組為 $0.81 \pm 0.126 \text{ mg/dl}$ ($P < 0.05$)) 。關於抗體投與組 , 0.5 mg/kg 組雖無有意差 , 但與溶劑處理組比較 , 於第 4 週、第 6 週 , 血中肌酸酐濃度降低。另外 , 1 mg/kg 組及 2 mg/kg 組與溶劑處理組比較 , 有意義地抑制血中肌酸酐濃度上升 (第 4 週 : 1 mg/kg 組為 $0.51 \pm 0.022 \text{ mg/dl}$ ($P < 0.05$) ; 2 mg/kg 組為 $0.51 \pm 0.015 \text{ mg/dl}$ ($P < 0.05$) , 第 6 週 : 1 mg/kg 組為 $0.55 \pm 0.043 \text{ mg/dl}$ ($P < 0.05$) ; 2 mg/kg 組為 $0.49 \pm 0.024 \text{ mg/dl}$ ($P < 0.01$)) 。

關於肌酸酐清除率 (尿中肌酸酐濃度 $\times 24$ 小時的尿量 / 血中肌酸酐濃度) , 於試驗開始之時間點 , 溶劑處理組與正常組比較 , 認為肌酸酐清除率減少 (正常組為 1.8 ± 0.18 ; 溶劑處理組為 1.3 ± 0.08 ($P < 0.01$)) 。之後 , 於第 4 週、第 6 週 , 溶劑處理組與正常組比較 , 肌酸酐清除率降低 (第 4 週 : 正常組為 2.1 ± 0.16 ; 溶劑處理組為 1.6 ± 0.16 , 第 6 週 : 正常組為 2.8 ± 0.29 ; 溶劑處理組為 1.4 ± 0.17 ($P < 0.001$)) 。關於抗體投與組 , 0.5 mg/kg 組與溶劑處理組比較 , 認為未抑制肌酸酐清除率降低。相對於此 , 1 mg/kg 組於第 4 週、第 6 週 , 與溶劑處理組比較 , 有意義地抑肌酸酐清除率降低 (第 4 週 : 溶劑處理組為 1.6 ± 0.16 ; 1 mg/kg 組為 2.1 ± 0.11 ($P < 0.05$) , 第 6 週 : 溶劑處理組為 1.4 ± 0.17 ; 1 mg/kg 組為 2.0 ± 0.18 ($P < 0.05$)) 。另外 , 2 mg/kg 組 , 於第 6 週與溶劑處理組比較 , 有意義地抑制肌酸酐清除率降低 (第 6 週 : 溶劑處理

組為 1.4 ± 0.17 ；2mg/kg 組為 1.9 ± 0.14 ($P < 0.05$)。

由此等結果，可確認完全人類型 37-45-MH1 於慢性腎臟病模式中，抑制腎機能降低。

(實施例 13：大鼠腎臟模式之藥理評估試驗)

大鼠抗 Thy1.1 模式係藉由注入對腎絲球體之腎膈細胞表面之 Thy 抗原之抗體而使發病之經確立之腎膈細胞增殖性腎絲球體腎炎模式 (例如參考 Yamamoto 及 Wilson, 1987 *Kidney Int.* 32:514-25, Morita 等, 1998 *Am J Kidney Dis* 31:559-73)。本模式係融解腎膈細胞後，腎膈細胞增殖及細胞外基質增加，尿蛋白質上升 (例如參考 Floege 等, 1991 *Kidney Int.* 40:477-88, Ito 等, 2001 *J Am Soc Nephrol.* 12:472-84)。抗 Thy1.1 模式係與人類之 IgA 腎病或過敏性紫斑症 (Henoch-Schönlein purpura) 類似，使用本模式，以蛋白尿為指標，可預測病態的發展 (例如參考 Kasuga 等, 2001 *Kidney Int.* 60:1745-55, Liu 等, 2007 *Nephron Exp Nephrol.* 105:e65-74)。

將抗 Thy1.1 抗體 (Anti-Rat CD90 (Thy1.1) monoclonal antibody-ascites; CEDARLANE 社)，以生理食鹽水調製成 0.1g/ml，對大鼠藉由靜脈內投與 (每 100g 體重為 200 μ l) 而使腎炎發病。投與抗 Thy1.1 抗體 4 小時後，靜脈內投與完全人類型 37-45-MH1 (0.5mg/kg、1mg/kg 或 2mg/kg) 或溶劑 (PBS)。自誘發病態 3 至 4 天後，進行 24 小時採尿，測定尿中蛋白質之 24 小時排泄量

(UP) 及尿中蛋白質排泄率 (UP/uCr: 以尿中肌酸酐濃度 (mg/dl) 修正尿中蛋白質濃度 (mg/ml))。其結果如表 3 (UP) 及表 4 (UP/uCr) 表示。

〔表 3〕

UP			
	UP (mg/日)	對溶劑投與組之 抑制率(%)	p 值
正常動物組	1.9	100.0	
溶劑投與組 (PBS)	114.3	0.0	p<0.001#
完全人類型 37-45-MH1 0.5mg/kg	115.2	-0.8	
完全人類型 37-45-MH1 1mg/kg	95.5	16.8	
完全人類型 37-45-MH1 2mg/kg	83.8	27.2	p=0.029*

: 與正常動物組之比較檢定(t 檢定)

* : 與溶劑投與組之比較檢定(Dunnett 檢定)

〔表 4〕

UP/uCr			
	UP/uCr (mg/mg)	對溶劑投與組之 抑制率(%)	p 值
正常動物組	0.315	100.0	
溶劑投與組(PBS)	33.865	0.0	p<0.001#
完全人類型 37-45-MH1 0.5mg/kg	26.280	22.6	
完全人類型 37-45-MH1 1mg/kg	22.487	33.9	p=0.037*
完全人類型 37-45-MH1 2mg/kg	18.427	46.0	p=0.0039*

: 與正常動物組之比較檢定(t 檢定)

* : 與溶劑投與組之比較檢定(Dunnett 檢定)

其結果係完全人類型 37-45-MH1 為用量依賴地抑制蛋白尿，對 2mg/kg 組對溶劑投與組之抑制率，以 UP 為指標時為 27.2%，UP/uCr 為 46.0%。

接著，於確認與 CLN1 作用強度之差異為目的，進行相同模式評估。評估步驟係與前述相同。評估係參考前述有效用量。以完全人類型 37-45-MH1 之 2mg/kg 為陽性對照，使用 CLN1 之 2mg/kg 及 10 倍用量之 20mg/kg。另外，調查因異種抗體處理之非特異的免疫反應之相關為目的，以人類型 IgG1 抗體（抗 KLH（鑰孔蟲戚血藍蛋白）抗體：以 KLH 對 VelocImmune 小鼠進行免疫，取得抗體。之後，與完全人類型 37-45-MH1 同樣地製作完全人類型 IgG1 抗體）之 2mg/kg 及 20mg/kg 為對照組。該結果如表 5（UP）及表 6（UP/uCr）所示。

[表 5]

UP

	UP (mg/日)	抑制率(%) vs 溶劑投與組	p 值	抑制率(%) vs IgG 投與組	p 值
正常動物組	0.8	100.0		100.0	
溶劑投與組(PBS)	111.1	0.0	p<0.001#		
對照組 IgG 2mg/kg	114.5	-3.1		0.0	p<0.001#
對照組 IgG 20mg/kg	113.4	-2.1		0.0	p<0.001#
CLN1 2mg/kg	97.2	12.6	p=0.45*	15.2	p=0.22&
CLN1 20mg/kg	107.3	3.5	p=0.79*	5.4	p=0.53\$
完全人類型 37-45-MH1 2mg/kg	79.0	29.1	p=0.044*	31.2	p=0.0011&

#：與正常動物組之比較檢定(t 檢定)
*：與溶劑投與組之比較檢定(t 檢定)
&：與對照組 IgG 2mg/kg 之比較檢定(t 檢定)
\$：與對照組 IgG 20mg/kg 之比較檢定(t 檢定)

〔表 6〕

UP/uCr

	UP/uCr (mg/mg)	抑制率(%) vs 溶劑投與組	p 值	抑制率(%) vs IgG 投與組	p 值
正常動物組	0.3	100.0		100.0	
溶劑投與組(PBS)	46.1	0.0	p<0.001#		
對照組 IgG 2mg/kg	52.2	-13.4		0.0	p<0.001#
對照組 IgG 20mg/kg	42.7	7.5		0.0	p<0.001#
CLN1 2mg/kg	36.3	21.5	p=0.18*	30.8	p=0.030&
CLN1 20mg/kg	41.8	9.5	p=0.49*	2.2	p=0.82\$
完全人類型 37-45-MH1 2mg/kg	28.1	39.2	p=0.0092*	46.4	p<0.001&

#：與正常動物組之比較檢定(t 檢定)

*：與溶劑投與組之比較檢定(t 檢定)

&：與對照組 IgG 2mg/kg 之比較檢定(t 檢定)

\$：與對照組 IgG 20mg/kg 之比較檢定(t 檢定)

其結果，病態係與前次大約相同的發病程度。接著，完全人類型 37-45-MH1 之 2mg/kg 係表示與前次評估大約相同之抑制率，以溶劑投與組為對照時之抑制率係以 UP 為指標時，2mg/kg 為 29.1%，UP/uCr 為 39.2%。

另一方面，CLN1 與完全人類型 37-45-MH1 相比較，蛋白尿抑制作用弱（2mg/kg 時，UP 及 UP/uCr 為指標時之對溶劑投與組之抑制率，分別為 12.6%及 21.5%；20mg/kg 時，UP 及 UP/uCr 為指標時之對溶劑投與組之抑制率，分別為 3.5%及 9.5%）。另外，人類型 IgG1 抗體對蛋白尿幾乎沒有影響。

由此可確認完全人類型 37-45-MH1 與 CLN1 比較，具有強力的蛋白尿抑制作用。

產業上利用性

本發明之抗人類 CTGF 抗體係有效地預防或治療以慢性腎臟病或糖尿病性腎病等之腎臟病爲首之 CTGF 參與病態形成之各種疾病。

序 列 表

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> 新穎抗人類CTGF抗體

<130> A12037TW

<150> JP2011-281811

<151> 2011-12-22

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗人類CTGF抗體之VH基因

<400> 1

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180

tcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt 300

aagtggaact acccttttga ctactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗人類CTGF抗體之VH

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15Ser 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
115

<210> 3
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之VL基因

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

<210> 4
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之VL

<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
Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Val Ser Thr Pro	85	90	95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	100	105	

<210> 5
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之重鏈基因

<400> 5	
caggtgcagc tggcgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat	180
tcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac	240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt	300
aagtggaact acccttttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc	360
tccaccaagg gccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcgggcc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc ttagtagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600

```

atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa      660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccccga tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag     1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag     1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga      1350

```

<210> 6
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗人類CTGF抗體之重鏈

<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

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> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之輕鏈基因

<400> 7
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gaagggccac tggcatocca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gatttactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgtagtgtt tttctgtcag cagtatgtca gcacaccgtg gacgttggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacggact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtgggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccgtg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggctgagct cgcccgctac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗人類CTGF抗體之輕鏈

<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

115120125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130135140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145150155160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165170175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180185190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195200205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210215

<210> 9
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之VH基因

<400> 9

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat180

gcccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt300

aagtggaact acccttttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctcctca357

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之VH

<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> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗人類CTGF抗體之重鏈

<400> 11
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
gccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt 300
aagtgggaact acccttttga ctactggggc caggggaaccc tggtcacogt ctctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggg	cttccccctg gcaccctcct	ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct	ggtcaaggac tacttccccg	aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag	cggcgtgcac accttccccg	ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc ttagtagcgt	ggtgaccgtg ccctccagca	gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia	gcccagcaac accaagggtg	acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtgaca aaactcacac	atgccaccg tgcccagcac	ctgaactcct ggggggaccg	720
tcagtcttcc tcttcccccc	aaaaccaag gacaccctca	tgatctcccg gaccctgag	780
gtcacatgcg tgggtggtga	cgtgagccac gaagaccctg	aggtcaagtt caactggtac	840
gtggacggcg tggaggtgca	taatgccaag acaaagccgc	gggaggagca gtacaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt	cctcaccgtc ctgcaccagg	actggctgaa tggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa	caaagccctc ccagccccca	tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga	accacaggtg tacaccctgc	cccatcccg ggatgagctg	1080
accaagaacc aggtcagcct	gacctgcctg gtcaaaggct	tctatcccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg	gcagccggag aacaactaca	agaccacgcc tcccgctgtg	1200
gactccgacg gctccttctt	cctctacagc aagctcaccg	tggacaagag caggtggcag	1260
caggggaacg tcttctcatg	ctccgtgatg catgaggctc	tgacaacca ctacacgcag	1320
aagagcctct ccctgtctcc	gggtaaatga		1350

- <210> 12
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 抗人類CTGF抗體之重鏈

<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

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
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> DNA
<213> 人類

<400> 13
atgaccgccg ccagtatggg ccccgctccgc gtcgccttcg tggtcctcct cgcacctctgc

agccggccgg ccgtcggcca gaactgcagc gggccgtgcc ggtgcccgga cgagccggcg 120
ccgcgctgcc cggcggggcgt gagcctcgtg ctggacggct gcggctgctg ccgcgtctgc 180
gccaagcagc tgggcgagct gtgcaccgag cgcgaccctt gcgaccgca caaggcctc 240
ttctgtgact tcggctcccc ggccaaccgc aagatcggcg tgtgcaccgc caaagatggt 300
gctccctgca tcttcgggtgg tacgggtgtac cgcagcggag agtccttcca gagcagctgc 360
aagtaccagt gcacgtgcct ggacggggcg gtgggctgca tgcccctgtg cagcatggac 420
gttcgtctgc ccagccctga ctgccccttc ccgaggaggg tcaagctgcc cgggaaatgc 480
tgcgaggagt ggggtgtgtga cgagcccaag gaccaaacgg tggttgggcc tgccctcgcg 540
gcttaccgac tggaagacac gtttggccca gaccaacta tgattagagc caactgcctg 600
gtccagacca cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctccaccgg 660
gttaccaatg acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg 720
ccttgogaag ctgacctgga agagaacatt aagaaggga aaaagtgcac ccgtactccc 780
aaaatctcca agcctatcaa gtttgagctt tctggctgca ccagcatgaa gacataccga 840
gctaaattct gtggagtatg taccgacggc cgatgctgca cccccacag aaccaccacc 900
ctgccggtgg agttcaagtg ccctgacggc gaggtcatga agaagaacat gatgttcac 960
aagacctgtg cctgccatta caactgtccc ggagacaatg acatctttga atcgctgtac 1020
tacaggaaga tgtacggaga catggcatga 1050

<210> 14
<211> 349
<212> PRT
<213> 人類

<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 65	Glu	Leu	Cys	Thr	Glu 70	Arg	Asp	Pro	Cys	Asp 75	Pro	His	Lys	Gly	Leu 80
Phe	Cys	Asp	Phe	Gly 85	Ser	Pro	Ala	Asn	Arg 90	Lys	Ile	Gly	Val	Cys 95	Thr
Ala	Lys	Asp	Gly 100	Ala	Pro	Cys	Ile	Phe 105	Gly	Gly	Thr	Val	Tyr 110	Arg	Ser
Gly	Glu	Ser 115	Phe	Gln	Ser	Ser	Cys 120	Lys	Tyr	Gln	Cys	Thr 125	Cys	Leu	Asp
Gly 130	Ala	Val	Gly	Cys	Met	Pro 135	Leu	Cys	Ser	Met	Asp 140	Val	Arg	Leu	Pro
Ser 145	Pro	Asp	Cys	Pro	Phe 150	Pro	Arg	Arg	Val	Lys 155	Leu	Pro	Gly	Lys	Cys 160
Cys	Glu	Glu	Trp	Val 165	Cys	Asp	Glu	Pro	Lys 170	Asp	Gln	Thr	Val	Val 175	Gly
Pro	Ala	Leu	Ala 180	Ala	Tyr	Arg	Leu	Glu 185	Asp	Thr	Phe	Gly	Pro 190	Asp	Pro
Thr	Met	Ile 195	Arg	Ala	Asn	Cys	Leu 200	Val	Gln	Thr	Thr	Glu 205	Trp	Ser	Ala
Cys	Ser 210	Lys	Thr	Cys	Gly	Met 215	Gly	Ile	Ser	Thr	Arg 220	Val	Thr	Asn	Asp
Asn 225	Ala	Ser	Cys	Arg	Leu 230	Glu	Lys	Gln	Ser	Arg 235	Leu	Cys	Met	Val	Arg 240
Pro	Cys	Glu	Ala	Asp 245	Leu	Glu	Glu	Asn	Ile 250	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys 255	Cys
Ile	Arg	Thr	Pro 260	Lys	Ile	Ser	Lys	Pro 265	Ile	Lys	Phe	Glu	Leu 270	Ser	Gly
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								

七、申請專利範圍：

1. 一種抗人類 CTGF 抗體，其特徵係含序列號碼 10 所示之胺基酸序列而成之重鏈可變區、及序列號碼 4 所示之胺基酸序列而成之輕鏈可變區。

2. 如申請專利範圍第 1 項之抗人類 CTGF 抗體，其中前述抗體之重鏈恆定區為人 Ig γ 1 恆定區。

3. 如申請專利範圍第 1 項之抗人類 CTGF 抗體，其中前述抗體之輕鏈恆定區為人 Ig κ 恆定區。

4. 如申請專利範圍第 1 項之抗人類 CTGF 抗體，其中前述抗體之重鏈恆定區為人 Ig γ 1 恆定區，前述抗體之輕鏈恆定區為人 Ig κ 恆定區。

5. 如申請專利範圍第 1 項之抗人類 CTGF 抗體，其含序列號碼 12 所示之胺基酸序列而成之重鏈、及序列號碼 8 所示之胺基酸序列而成之輕鏈。

6. 一種聚核苷酸，其特徵係含編碼如申請專利範圍第 1 項之抗體之重鏈可變區之序列。

7. 一種聚核苷酸，其特徵係含編碼如申請專利範圍第 1 項之抗體之輕鏈可變區之序列。

8. 一種表現載體，其特徵係含如申請專利範圍第 6 項及/或第 7 項之聚核苷酸。

9. 一種宿主細胞，其特徵係以如申請專利範圍第 8 項之表現載體所轉型。

10. 如申請專利範圍第 9 項之宿主細胞，其係選自後述 (a) 及 (b) 所成群，

(a) 以含有含編碼如申請專利範圍第 1 項之抗體之重鏈可變區之序列之聚核苷酸與含編碼該抗體之輕鏈可變區之序列之聚核苷酸之表現載體所轉型之宿主細胞；及

(b) 以含有含編碼如申請專利範圍第 1 項之抗體之重鏈可變區之序列之聚核苷酸之表現載體與含有含編碼該抗體之輕鏈可變區之序列之聚核苷酸之表現載體所轉型之宿主細胞。

11. 一種生產如申請專利範圍第 1 項之抗人類 CTGF 抗體之方法，其特徵係包含培養如申請專利範圍第 9 項或第 10 項之宿主細胞，使抗人類 CTGF 抗體表現之步驟。