

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391586** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.14

(22) Дата подачи заявки
2021.12.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/22* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИТЕЛО ПРОТИВ
ФАКТОРА РОСТА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

(31) 202011405490.5; 202111366667.X

(32) 2020.12.03; 2021.11.18

(33) CN

(86) PCT/CN2021/135203

(87) WO 2022/117060 2022.06.09

(71) Заявитель:

**ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Ма Сячжэнь, У Тинтин, Лю Сюнь
(CN)**

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против фактора роста соединительной ткани. В другом аспекте, дополнительно предложено применение данной фармацевтической композиции, содержащей антитело против фактора роста соединительной ткани.

A1

202391586

202391586

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ АНТИТЕЛО ПРОТИВ ФАКТОРА РОСТА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

Настоящее раскрытие принадлежит к области фармацевтических препаратов и, в частности, относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, и к ее применению в качестве лекарственного средства.

10

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сообщения в данном документе просто предоставляют базовую информацию, относящуюся к настоящему раскрытию, и не обязательно могут составлять предшествующий уровень техники.

15

Экспрессия фактора роста соединительной ткани (CTGF) индуцируется членами надсемейства трансформирующего фактора роста β (TGF β). Данное надсемейство включает TGF β -1, -2 и -3, морфогенный белок кости (BMP)-2 и активин. Многие модуляторы, включая дексаметазон, тромбин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиотензин II, и стимулы окружающей среды, включая гипергликемию и гипертензию, также индуцируют экспрессию CTGF.

20

Стимуляция экспрессии CTGF посредством TGF β является быстрой и длительной, и не требует постоянного применения TGF β . TGF β активирует транскрипцию посредством регуляторных элементов ДНК в промоторе CTGF, приводя к повышенной экспрессии CTGF. Экспрессия CTGF подвергается повышающей регуляции при гломерулонефрите, первичной нефропатии IgA-типа, очаговом и сегментарном гломерулосклерозе и диабетической нефропатии. Увеличение числа клеток, экспрессирующих CTGF, также наблюдается в сайтах хронического тубулоинтерстициального повреждения, и уровни CTGF коррелируют со степенью повреждения. Кроме того, экспрессия CTGF увеличивается в клубочках и тубулоинтерстициальной ткани при целом ряде почечных заболеваний, ассоциированных с образованием рубцов и склерозом почечной паренхимы. Повышенные уровни CTGF также ассоциированы с фиброзом печени, инфарктом миокарда и фиброзом легкого. Например, у пациентов с идиопатическим фиброзом легкого (IPF) CTGF подвергается сильной повышающей регуляции в биопсиях и клетках жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Таким

35

образом, CTGF представляет собой правильную терапевтическую мишень при описанных выше заболеваниях.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CTGF. Данная композиция имеет преимущества наличия хорошей стабильности, хорошей морфологии лиофилизата и т.д.

10

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

15

i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 7;

20

или

25

ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 8, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 9.

30

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

35

ii-i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 69, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 70;

или

ii-ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 85, и
 5 переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 70.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF
 10 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

iii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные
 15 в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно; или

iv) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные
 в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF
 20 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

iv-i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76,
 25 соответственно; или

iv-ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 104, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76
 30 соответственно.

В некоторых воплощениях антитело против CTGF согласно любому из
 35 приведенных выше, представляет собой мышинное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

5 (v-1) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, 27, 28 или 29, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25 или 26;

10 (vi-1) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8, 33, 34, 35 или 36, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9, 30, 31 или 32; или

15 (vi-i) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 69, 81, 82, 83, 84 или 85, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 70, 77, 78, 79 или 80.

20 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

(v) переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 6, 27, 28 или 29, и переменная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 7, 22, 23, 24, 25 или 26; или

(vi) переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 8, 33, 34, 35 или 36, и переменная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-

ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 9, 30, 31 или 32; или

5 переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 7;

10 переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 27, 28 или 29, и переменная область легкой цепи
15 имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25 или 26;

20 переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 8, и переменная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 9;

25 переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 33, 34, 35 или 36, и переменная область легкой цепи
30 имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 30, 31 или 32.

35 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

(vi-ii) переменная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 69, 81, 82, 83, 84 или 85, и переменная область легкой цепи имеет по меньшей мере 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с переменной областью легкой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 70, 77, 78, 79 или 80.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF представляет собой гуманизированное антитело, содержащее каркасную область человеческого антитела или каркасную область его варианта, и данный вариант каркасной области имеет самое большее 10 обратных мутаций в каркасной области легкой цепи и/или каркасной области тяжелой цепи человеческого антитела.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано ниже:

(a) переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию аминокислот, выбранную из группы, состоящей из 4L, 36F, 43S, 45K, 47W, 58V и 71Y, и/или переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию аминокислот, выбранную из группы, состоящей из 28S, 30N, 49A, 75E, 76S, 93V, 94E и 104D; или

(b) переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 36V, 44F, 46G и 49G, и/или переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 44G, 49G, 27F, 48L, 67L, 71K, 78V и 80F.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано ниже:

5 (b-i) переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 74; SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 45P, 46W, 48Y, 69S и 70Y, и переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и
10 SEQ ID NO: 73, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию 27F, 38K, 48I, 67K, 68A, 70L и 72F; или

(b-ii) переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 74; SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию, выбранную из группы, состоящей из 45P, 46W, 48Y, 69S и 70Y, и переменная область тяжелой цепи
15 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 104, соответственно, и содержит одну или более чем одну обратную мутацию 27F, 38K, 48I, 67K, 68A, 70L и 72F.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано ниже:

(vii) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи имеет
25 последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7;

(viii) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 27, 28 или 29, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25 или 26;

(ix) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, и переменная область легкой цепи имеет
30 последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9; или

(x) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 33, 34, 35 или 36, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 30, 31 или 32.

35 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF

содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как показано ниже:

(xi) переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 69, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 70; или

(xii) переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84 или 85, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 77, 78, 79 или 80.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как показано в Таблице 1, Таблице 2 и Таблице 3 ниже:

Таблица 1: комбинации переменных областей легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела, полученного из mab147

	Hu147-VL1 SEQ ID NO: 22	Hu147-VL2 SEQ ID NO: 23	Hu147-VL3 SEQ ID NO: 24	Hu147-VL4 SEQ ID NO: 25	Hu147-VL5 SEQ ID NO: 26
Hu147-VH1 SEQ ID NO: 27	Hu147-11	Hu147-12	Hu147-13	Hu147-14	Hu147-15
Hu147-VH2 SEQ ID NO: 28	Hu147-21	Hu147-22	Hu147-23	Hu147-24	Hu147-25
Hu147-VH3 SEQ ID NO: 29	Hu147-31	Hu147-32	Hu147-33	Hu147-34	Hu147-35

Таблица 2: комбинации переменных областей легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела mab164

	Hu164-VH5 SEQ ID NO: 33	Hu164-VH6 SEQ ID NO: 34	Hu164-VH7 SEQ ID NO: 35	Hu164-VH8 SEQ ID NO: 36
Hu164-VL7 SEQ ID NO: 30	Hu164-57	Hu164-67	Hu164-77	Hu164-87
Hu164-VL8 SEQ ID NO: 31	Hu164-58	Hu164-68	Hu164-78	Hu164-88

Hu164-VL9 SEQ ID NO: 32	Hu164-59	Hu164-69	Hu164-79	Hu164-89
----------------------------	----------	----------	----------	----------

Таблица 3: комбинации переменных областей легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела mab95

	Hu95-VH1 SEQ ID NO: 81	Hu95-VH2 SEQ ID NO: 82	Hu95-VH3 SEQ ID NO: 83	Hu95-VH4 SEQ ID NO: 84	Hu95-VH5 SEQ ID NO: 85
Hu95-VL1 SEQ ID NO: 77	Hu95-11	Hu95-21	Hu95-31	Hu95-41	Hu95-51
Hu95-VL2 SEQ ID NO: 78	Hu95-12	Hu95-22	Hu95-32	Hu95-42	Hu95-52
Hu95-VL3 SEQ ID NO: 79	Hu95-13	Hu95-23	Hu95-33	Hu95-43	Hu95-53
Hu95-VL4 SEQ ID NO: 80	Hu95-14	Hu95-24	Hu95-34	Hu95-44	Hu95-54

5 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как показано ниже:

10 (xiii) переменная область тяжелой цепи, имеющая аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 27, и переменная область легкой цепи, имеющая аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 22;

15 (xiv) переменная область тяжелой цепи, имеющая аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 34, и переменная область легкой цепи, имеющая аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 30; или

20 (xv) переменная область тяжелой цепи, имеющая аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 85, и переменная область легкой цепи, имеющая аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 77.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF

дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи; предпочтительно константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и их традиционных вариантов, и константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей цепей κ и λ человеческого антитела и их традиционных вариантов; более предпочтительно данное антитело содержит константную область тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 37 или 38, и константную область легкой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 39 или 40.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит следующее:

(с) тяжелая цепь, имеющая по меньшей мере 85%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с тяжелой цепью, имеющей последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 41, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, и легкая цепь, имеющая по меньшей мере 85%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с легкой цепью, имеющей последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 42, 49, 50, 51, 52 или 53;

(d) тяжелая цепь, имеющая по меньшей мере 85%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с тяжелой цепью, имеющей последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 63, и легкая цепь, имеющая по меньшей мере 85%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность с легкой цепью, имеющей последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 55, 64, 65 или 66;

(е) тяжелая цепь, имеющая последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 41, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, и легкая цепь, имеющая последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 42, 49, 50, 51, 52 или 53; или

(f) тяжелая цепь, имеющая последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 или 63, и легкая цепь, имеющая последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 55, 64, 65 или 66.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит следующее:

(g) тяжелая цепь, имеющая по меньшей мере 85%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, и легкая цепь, имеющая по меньшей мере 85%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 87, 98, 99, 100 или 101; или

(h) тяжелая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, и легкая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 87, 98, 99, 100 или 101.

10 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF содержит следующее:

(j) тяжелая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 46, и легкая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 49;

15 (k) тяжелая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 61, и легкая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 64; или

(l) тяжелая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 97, и легкая цепь, изложенная в SEQ ID NO: 98.

20 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, где данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит буфер. В некоторых воплощениях данный буфер представляет собой буфер на основе соли гистидина, ацетатный буфер, цитратный буфер, сукцинатный буфер или фосфатный буфер. В некоторых воплощениях данный буфер представляет собой гистидиново-гидрохлоридный буфер или гистидиново-ацетатный буфер. В некоторых воплощениях данный буфер представляет собой гистидиново-гидрохлоридный буфер.

30 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, где данная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,5. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,0. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3, примерно 5,4, примерно 5,5, примерно 5,6, примерно 5,7, примерно 5,8, примерно 5,9, примерно 6,0, примерно 6,1, примерно 6,2, примерно 6,3, примерно 6,4 или примерно 5,5. В 35 некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,0-6,5. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,0-6,0. В

некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5-5,7. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4 или 6,5, или в любом интервале между данными точечными значениями.

- 5 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой антитело против CTGF находится в концентрации от примерно 100 мг/мл до примерно 200 мг/мл. В некоторых воплощениях антитело против CTGF находится в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл. В некоторых воплощениях антитело
- 10 против CTGF находится в концентрации примерно 100 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 120 мг/мл, примерно 130 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 150 мг/мл, примерно 160 мг/мл, примерно 170 мг/мл, примерно 180 мг/мл, примерно 190 мг/мл или примерно 200 мг/мл. В некоторых воплощениях антитело против CTGF находится в концентрации от 100 мг/мл до 200 мг/мл. В некоторых
- 15 воплощениях антитело против CTGF находится в концентрации от 150 мг/мл до 200 мг/мл. В некоторых воплощениях антитело против CTGF находится в концентрации от 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл или 200 мг/мл, или в любом интервале между данными точечными значениями.
- 20 В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше, где данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых воплощениях данное поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество. В некоторых воплощениях
- 25 данное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата, полисорбата 20, полисорбата 80, полочсамера, Triton, додецилсульфоната натрия, лаурилсульфоната натрия, октилгликозида натрия, лаурил-сульфобетаина, миристил-сульфобетаина, линолеил-сульфобетаина, стеарил-сульфобетаина, лаурил-саркозина, миристил-саркозина, линолеил-
- 30 саркозина, стеарил-саркозина, линолеил-бетаина, миристил-бетаина, цетил-бетаина, лаурамидопропил-бетаина, кокарамидпропил-бетаина, линолеинамидпропил-бетаина, миристиламидпропил-бетаина, пальмитамидпропил-бетаина, изостеариламидпропил-бетаина, миристиламидпропил-диметиламина, пальмитамидпропил-диметиламина,
- 35 изостеариламидпропил-диметиламина, натрия метилкооила, натрия метилолеилтаурата, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера

этилена и пропиленгликоля и тому подобных. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80, полисорбат 20 или полуксамер 188. В некоторых воплощениях

5 поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой поверхностно-активное вещество находится в концентрации от примерно 0,05 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл. В некоторых воплощениях данное поверхностно-активное вещество

10 находится в концентрации от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл. В некоторых воплощениях данное поверхностно-активное вещество находится в концентрации примерно 0,05 мг/мл, примерно 0,1 мг/мл, примерно 0,2 мг/мл, примерно 0,3 мг/мл, примерно 0,4 мг/мл, примерно 0,5 мг/мл, примерно 0,6 мг/мл, примерно 0,7 мг/мл, примерно 0,8 мг/мл, примерно 0,9 мг/мл или примерно 1,0

15 мг/мл. В некоторых воплощениях данное поверхностно-активное вещество находится в концентрации от 0,05 мг/мл до 1,0 мг/мл. В некоторых воплощениях данное поверхностно-активное вещество находится в концентрации от 0,2 мг/мл до 0,6 мг/мл. В некоторых воплощениях данное поверхностно-активное вещество находится в концентрации 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5

20 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл или 1,0 мг/мл, или в любом интервале между данными точечными значениями.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, где данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит сахар. В некоторых воплощениях данный

25 сахар выбран из группы, состоящей из традиционного состава $(\text{CH}_2\text{O})_n$ и его производных, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахароспирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и тому подобное. Данный сахар может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, декстрана, глицерина,

30 эритритола, глицерола, арабитола, силитола, сорбита, маннита, меллибиозы, мелецитозы, раффинозы, маннотриозы, стахиозы, мальтозы, лактулозы, мальтулозы, глюцитолола, мальтитолола, лактитолола, изомальтулозы и тому подобных. В некоторых воплощениях данный сахар выбран из одного или более чем одного из сахарозы, маннита и трегалозы. В некоторых воплощениях данный сахар

35 представляет собой сахарозу.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой сахар находится в концентрации от примерно 20 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации от примерно 40 мг/мл до примерно 80 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации от примерно 60 мг/мл до примерно 80 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации примерно 20 мг/мл, примерно 30 мг/мл, примерно 40 мг/мл, примерно 50 мг/мл, примерно 60 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 90 мг/мл или примерно 100 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации от 20 мг/мл до 100 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации от 40 мг/мл до 80 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации от 60 мг/мл до 80 мг/мл. В некоторых воплощениях сахар находится в концентрации 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл, или в любом интервале между данными точечными значениями.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, в которой буфер находится в концентрации от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ. В некоторых воплощениях данный буфер находится в концентрации от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ. В некоторых воплощениях данный буфер находится в концентрации примерно 5 мМ, примерно 10 мМ, примерно 20 мМ, примерно 30 мМ, примерно 40 мМ, примерно 50 мМ, примерно 60 мМ, примерно 70 мМ, примерно 80 мМ, примерно 90 мМ или примерно 100 мМ. В некоторых воплощениях данный буфер находится в концентрации от 5 мМ до 100 мМ. В некоторых воплощениях данный буфер находится в концентрации от 30 мМ до 70 мМ. В некоторых воплощениях данный буфер находится в концентрации от 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ, или в любом интервале между данными точечными значениями.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, где данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный стабилизатор. В некоторых воплощениях данный дополнительный стабилизатор возможно представляет собой соль, сахароспирт, поверхностно-активное вещество, полиэфир, аминокислоту, хелатор или тому подобное. В некоторых воплощениях данный дополнительный стабилизатор выбран из группы, состоящей из PEG (полиэтиленгликоль), аргинина и EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота). В

некоторых воплощениях PEG представляет собой PEG 3350 или PEG 4000. В некоторых воплощениях PEG находится в концентрации от 10 мг/мл до 50 мг/мл. В некоторых воплощениях PEG находится в концентрации 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл или 50 мг/мл. В некоторых воплощениях аргинин находится в концентрации от 10 мМ до 100 мМ. В некоторых воплощениях аргинин находится в концентрации 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ. В некоторых воплощениях EDTA находится в концентрации от 0,5 мМ до 10 мМ. В некоторых воплощениях EDTA находится в концентрации 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ или 10 мМ, или в любом интервале между данными точечными значениями.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше содержит следующие компоненты:

(а) антитело против CTGF в концентрации от примерно 100 мг/мл до примерно 200 мг/мл, (b) от примерно 0,05 мг/мл до примерно 1 мг/мл поверхностно-активного вещества, (c) от примерно 20 мг/мл до примерно 100 мг/мл сахара и (d) от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ буфера на основе соли гистидина; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше содержит следующие компоненты:

(а) антитело против CTGF в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, (b) от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл полисорбата, (c) от примерно 40 мг/мл до примерно 80 мг/мл сахара и (d) от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ буфера на основе соли гистидина; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,0.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше содержит следующие компоненты:

(а) антитело против CTGF в концентрации примерно 150 мг/мл, (b) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 70 мг/мл сахарозы и (d) примерно 50 мМ буфера на основе гидрохлорида гистидина; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,5 до примерно 5,7.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенного выше содержит следующие компоненты:

(а) антитело против CTGF в концентрации примерно 150 мг/мл, (b) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 70 мг/мл сахарозы и (d) примерно 50 мМ гистидина-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH примерно 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 5 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH от 5,5 до 5,7.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 10 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 15 (a) антитело против CTGF в концентрации 200 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM ацетатный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,0-5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 20 (a) антитело против CTGF в концентрации 200 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM гистидин-ацетатный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 25 (a) антитело против CTGF в концентрации 200 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM сукцинатный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 30 (a) антитело против CTGF в концентрации 200 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM цитратный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 35 (a) антитело против CTGF в концентрации 200 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 mM гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5-6,5. В

некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5; 6,0 или 6,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 5 (a) антитело против CTGF в концентрации 200 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ фосфатный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 6,0-6,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 10 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 6,0.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 15 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,6 мг/мл полисорбата 20, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 20 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 25 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,6 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

- 30 (a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полоксамера 188, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полоксамера 188, (c) 70 мг/мл сахарозы и (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы, (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер и (e) 2% PEG 3350; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы, (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер и (e) 50 мМ аргинин; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы, (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер и (e) 1% маннита; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл сахарозы, (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер и (e) 0,5-10 мМ EDTA; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях EDTA находится в концентрации 0,5 мМ, 5 мМ или 10 мМ.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше содержит следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации 150 мг/мл, (b) 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) 70 мг/мл трегалозы, (d) 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH 5,5.

В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, где данная фармацевтическая композиция представляет собой жидкий препарат. В некоторых воплощениях данный жидкий препарат содержит воду в качестве растворителя.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, где данный лиофилизированный препарат может

образовать, при восстановлении, фармацевтическую композицию согласно любому из приведенных выше.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ получения лиофилизированного препарата, который включает стадию
5 осуществления лиофилизации фармацевтической композиции согласно любому из приведенных выше.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, который получают осуществлением лиофилизации фармацевтической композиции согласно любому из приведенных выше. В
10 некоторых воплощениях лиофилизация согласно любому из приведенных выше включает последовательные стадии предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки. В некоторых воплощениях данный лиофилизированный препарат является стабильным при 40°C в течение по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 14 суток или по меньшей мере 28 суток.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен восстановленный раствор, где данный восстановленный раствор получают растворением лиофилизированного препарата согласно любому из приведенного
15 выше; возможно данный восстановленный раствор получают растворением лиофилизированного препарата согласно любому из приведенных выше в физиологически приемлемом растворителе, включающем воду для инъекции, нормальный физиологический раствор и буферы, но не ограничивающимся ими.
20

В некоторых воплощениях описанный выше восстановленный раствор содержит следующее:

(а) антитело против CTGF в концентрации от примерно 150 мг/мл до
25 примерно 200 мг/мл, (b) от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл полисорбата, (с) от примерно 40 мг/мл до примерно 80 мг/мл сахара и (d) от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ буфера на основе соли гистидина; причем данная фармацевтическая композиция имеет рН от примерно 5,0 до примерно 6,0.

В некоторых воплощениях описанный выше восстановленный раствор
30 содержит следующее:

(а) антитело против CTGF в концентрации примерно 150 мг/мл, (b) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80, (с) примерно 70 мг/мл сахарозы и (d) примерно 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция
35 имеет рН от примерно 5,5 до примерно 5,7.

В некоторых воплощениях описанный выше восстановленный раствор
содержит следующее:

(a) антитело против CTGF в концентрации примерно 150 мг/мл, (b) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 70 мг/мл сахарозы и (d) примерно 50 мМ гистидин-гидрохлоридный буфер; причем данная фармацевтическая композиция имеет pH примерно 5,5.

5 В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция или восстановленный раствор согласно любому из приведенных выше представляет собой препарат для внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекции; в некоторых воплощениях фармацевтическая композиция или восстановленный раствор согласно любому из приведенных выше
10 представляет собой препарат для внутривенной инъекции. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция или восстановленный раствор согласно любому из приведенных выше подходит для внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекции. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция или восстановленный раствор, или
15 лиофилизированный препарат согласно любому из приведенных выше предназначен для применения в получении лекарственного средства для внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекции.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложено изделие, которое содержит контейнер, содержащий фармацевтическую композицию
20 согласно любому из приведенных выше, лиофилизированный препарат согласно любому из приведенных выше или восстановленный раствор согласно любому из приведенных выше.

В некоторых воплощениях согласно настоящему раскрытию дополнительно предложено применение фармацевтической композиции согласно любому из
25 приведенных выше, лиофилизированного препарата согласно любому из приведенных выше, восстановленного раствора согласно любому из приведенных выше или изделия согласно любому из приведенных выше в получении лекарственного средства для лечения заболевания, ассоциированного с CTGF.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ
30 лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с CTGF, который включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции согласно любому из приведенных выше, лиофилизированного препарата согласно любому из приведенных выше, восстановленного раствора согласно любому из приведенных выше или изделия согласно любому из
35 приведенных выше.

В некоторых воплощениях согласно настоящему раскрытию дополнительно предложена фармацевтическая композиция согласно любому из приведенных выше, лиофилизированный препарат согласно любому из приведенных выше, восстановленный раствор согласно любому из приведенных выше или изделие согласно любому из приведенных выше для применения в лечении заболевания, ассоциированного с CTGF.

В некоторых воплощениях заболевание, ассоциированное с CTGF, представляет собой фиброзное заболевание, гипертензию, диабет, инфаркт миокарда, артрит, ассоциированное с CTGF заболевание, связанное с пролиферацией клеток, атеросклероз, глаукому или рак. В некоторых воплощениях данное фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: идиопатический легочный фиброз, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, остеоартрит, склеродермия, хроническая сердечная недостаточность, цирроз печени и фиброз почки. В некоторых воплощениях данное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: острый лимфобластный лейкоз, дерматофиброма, рак молочной железы, ангиолипома, ангиолейомиома, десмопластический рак, рак предстательной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, желудочно-кишечный рак и рак печени.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1: аффинность гуманизированного антитела, полученного из mab164, в отношении человеческого CTGF при измерении посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ).

ФИГ. 2: экспериментальные результаты ингибирования ксенотрансплантатов опухолей SU86.86 у мышей посредством гуманизированного антитела, полученного из mab147 или mab164.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Термины

Для того, чтобы облегчить понимание настоящего раскрытия, некоторые технические и научные термины конкретно определяются ниже. Если конкретно не определено в данном документе, все другие технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют значения, обычно понятные обычным специалистам в области, к которой принадлежит настоящее раскрытие.

Трехбуквенные и однобуквенные коды аминокислот, используемые в данном документе, являются такими, как описано в *J. biol. chem*, 243, p3558 (1968).

Фактор роста соединительной ткани (CTGF) представляет собой 36 кДа, обогащенный цистеином, гепаринсвязывающий, секретируемый гликопротеин, изначально выделенный из эндотелиальных клеток пупочной вены человека. CTGF принадлежит к семейству CCN (CTGF, Cugb1, Nov) белков (секретируемых гликопротеинов), которое включает индуцируемый сывороткой продукт немедленного раннего гена Cugb1, предположительный онкоген Nov, ассоциированный с ECM (внеклеточный матрикс) белок FISP-12, индуцируемый src ген CEF-10, индуцируемый Wnt секретируемый белок WISP-3 и антипролиферативный белок HICP/rCOP. Белки CCN отличаются 38 консервативными остатками цистеина, которые составляют больше, чем 10% от общего содержания аминокислот и образуют модульную структуру с N-концевым и C-концевым доменами. Модульная структура CTGF включает консервативные мотивы белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGF-BP), и фактора фон Виллебранда (VWC) в N-концевом домене, тромбоспондин (TSP1) и мотив цистеинового узла в C-концевом домене. CTGF по настоящему раскрытию включает белки дикого типа любого происхождения или варианты, которые сохраняют их функцию.

Термин «антитело» по настоящему раскрытию используется в его самом широком смысле и охватывает целый ряд структур антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), полноразмерные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (также известные как «антигенсвязывающие группировки»), мышинные антитела, химерные антитела или гуманизированные антитела или антитела с созревшей аффинностью, но не ограничиваясь ими, при условии, что они демонстрируют желательную антигенсвязывающую активность. Природными антителами называют встречающиеся в природе молекулы иммуноглобулинов. Например, природные антитела IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые связаны дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь от N- до C-конца имеет переменную область (VH), также известную как переменный тяжелый домен или переменный домен тяжелой цепи, с последующими тремя константными доменами (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N- до C-конца каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), также известную как

вариабельный легкий домен или вариабельный домен легкой цепи, с последующим константным легким (CL) доменом. Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «полное антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо для названия антитела, имеющего по существу аналогичную структуру структуре природного антитела или имеющего тяжелые цепи, которые содержат область Fc, как определено в данном документе. В некоторых воплощениях полноразмерные антитела по настоящему раскрытию включают полноразмерные антитела, образованные связыванием вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи из комбинаций вариабельных областей легкой и тяжелой цепи в Таблице 1, Таблице 2 и Таблице 3 с константной областью легкой цепи и константной областью тяжелой цепи соответственно. Специалисты в данной области могут отбирать разные происходящие из антител константные области легкой цепи и константные области тяжелой цепи согласно актуальным потребностям, например, происходящие из человеческих антител константные области легкой цепи и константные области тяжелой цепи.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену в тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Каждый VH и VL содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три области, определяющие комплементарность (CDR). Термин «область, определяющая комплементарность» или «CDR» относится к областям в пределах вариабельного домена, которые, главным образом, содействуют связыванию антигена; термин «каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков CDR. VH содержит 3 области CDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 области CDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Одиночный VH или VL может быть достаточным для придания специфичности связывания антигена.

Границы аминокислотных последовательностей CDR могут быть определены с использованием целого ряда хорошо известных схем, таких как схема нумерации «Kabat» (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), схема нумерации «Chothia», схема нумерации «AbM», «контактная» схема нумерации (см. Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) и схема нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (см. Lefranc

M.P., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)). Связи между схемами нумерации, включающими, например, схему нумерации Kabat и схему нумерации IMGT, хорошо известны специалистам в данной области и показаны в Таблице 4 ниже.

Таблица 4. Связи между схемами нумерации для CDR

	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Контактная
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	50-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	50-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

5

«Класс» антитела относится к типу константной области, которую содержат его тяжелые цепи. Согласно аминокислотным последовательностям константных областей легкие цепи антител попадают в две категории: каппа (κ) и лямбда (λ). Согласно различиям в составе аминокислот и порядку расположения константных областей тяжелых цепей антител антитела могут быть разделены на пять классов, иначе именуемых изотипы антител, а именно: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответствующие тяжелые цепи которых представляют собой цепь μ , цепь δ , цепь γ , цепь α и цепь ϵ соответственно. Ig того же самого класса могут быть подразделены на разные подклассы согласно различиям в аминокислотном составе шарнирных областей и числу и положению дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть подразделен на IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Каждый из пяти классов Ig может иметь цепь κ или цепь λ . «Традиционный вариант» константной области тяжелой цепи человеческого антитела и константной области легкой цепи человеческого антитела, описанного в данном документе, относится к варианту константной области тяжелой цепи или константной области легкой цепи, происходящему от человека, который был раскрыт в предшествующем уровне техники и не изменяет структуру и функцию вариабельной области антитела. Типичные варианты включают варианты константной области тяжелой цепи IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ с сайт-направленными модификациями и заменами аминокислот в константной области тяжелой цепи. В некоторых воплощениях данные замены представляют собой мутации YTE (M252Y/S254T/T256E), мутацию L234A и/или мутацию L235A, мутацию S228P и/или мутации, которые приводят к структурам типа выступ во впадину. Было показано то, что данные мутации придают новые свойства антителам без изменения функции вариабельных областей антител. В некоторых воплощениях данное антитело относится к изотипу IgG₁ с мутациями P329, P234 и P235 в шарнирной области для уменьшения эффекторной функции. В

10

15

20

25

30

некоторых воплощениях данное антитело относится к изотипу IgG₂. В некоторых воплощениях данное антитело относится к изотипу IgG₄ с мутацией S228P в шарнирной области для улучшения стабильности антитела IgG₄.

Термин «фрагмент антитела» относится к отличной от интактного антитела молекуле; он содержит часть интактного антитела, и данная часть связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, однодоменные антитела, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин «область Fc» или «область кристаллизуемого фрагмента» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая области Fc природной последовательности и варианты области Fc. В некоторых воплощениях область Fc тяжелой цепи человеческого IgG определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксиконца. Границы области Fc тяжелой цепи антитела также могут изменяться, например, посредством делеции C-концевого лизина области Fc (остаток 447 согласно схеме нумерации EU) или делеции C-концевого глицина и лизина области Fc (остатки 446 и 447 согласно схеме нумерации EU). Соответственно, в некоторых воплощениях композиция интактных антител может содержать популяции антител со всеми удаленными остатками K447 и/или остатками G446 плюс K447. В некоторых воплощениях композиция интактных антител может содержать популяции антител без удаленных остатков K447 и/или остатков G446 плюс K447. В некоторых воплощениях композиция интактных антител содержит популяции антител, имеющие смесь антител с остатками K447 и/или остатками G446 плюс K447 или без них. Подходящие области Fc с природными последовательностями для антител, описанных в данном документе, включают человеческие IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4. Если в данном документе не определено иначе, нумерация аминокислотных остатков в области Fc или константной области соответствует схеме нумерации EU, также известной как индекс EU, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

«Мышиное антитело» в настоящем раскрытии представляет собой моноклональное антитело против человеческого CTGF, которое происходит от мышей, и его получают согласно знаниям и квалификации в данной области. Во время получения анализируемому субъекту инъецируют антиген CTGF, и затем

выделяют гибридому антител, экспрессирующую желательную последовательность или функциональные свойства. В одном предпочтительном воплощении настоящего раскрытия мышинное антитело против CTGF или его антигенсвязывающий фрагмент может дополнительно содержать константную область легкой цепи мышинной цепи κ или λ , или ее варианта, или дополнительно содержать константную область тяжелой цепи мышинного IgG₁, IgG₂ или IgG₃, или ее варианта.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, полученному слиянием переменной области мышинного антитела и константной области человеческого антитела, что может снижать иммунный ответ, индуцированный мышинным антителом. Химерное антитело создается, во-первых, созданием гибридомы, секретирующей мышинное специфичное моноклональное антитело, затем клонированием гена переменной области из мышинных гибридомных клеток, клонированием гена константной области человеческого антитела, как требуется, соединением гена мышинной переменной области и гена человеческой константной области в химерном гене, вставкой данного химерного гена в экспрессионный вектор и, наконец, осуществлением экспрессии молекул химерного антитела в эукариотической системе или прокариотической системе. В предпочтительном воплощении настоящего раскрытия легкая цепь антитела данного химерного антитела дополнительно содержит константную область легкой цепи человеческой цепи κ или λ , или ее вариант. Тяжелая цепь антитела химерного антитела против CTGF дополнительно содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄, или его варианта, предпочтительно константную область тяжелой цепи человеческого IgG₁, IgG₂ или IgG₄, или варианта IgG₁, IgG₂ или IgG₄, полученного с использованием мутации аминокислоты (например, мутация L234A и/или L235A, и/или мутация S228P).

«Гуманизированное антитело», также известное как антитело с привитой CDR, относится к антителу, полученному прививкой последовательностей мышинной CDR в каркас переменной области человеческого антитела, т.е. в другой тип последовательности каркаса антитела. Такое антитело может преодолевать гетерогенную реакцию, индуцированную химерным антителом, из-за того, что оно несет большое количество мышинного белкового компонента. Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии генов переменных областей человеческой тяжелой и легкой

цепи можно найти в базе данных последовательностей человеческих соединений «VBase», а также в Kabat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition. Для того, чтобы избежать уменьшения активности, вызванного снижением иммуногенности, каркасную последовательность в варибельной области человеческого антитела можно подвергать минимальной обратной мутации или обратной мутации для поддержания или усиления активности. Гуманизированное антитело по настоящему раскрытию также включает гуманизированные антитела, которые дополнительно подвергались мутации созревания аффинности CDR посредством дрожжевого дисплея.

Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером связывания (например, антигеном). Если не указано иное, термин «аффинность связывания» в том виде, как он используется в данном документе, относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X в отношении ее лиганда Y обычно может быть выражена константой диссоциации (KD). Аффинность можно определять традиционными способами, известными в данной области, включая способы, описанные в данном документе. Конкретные иллюстративные и типичные примеры измерения аффинности связывания описываются ниже. Термин «kassoc» или «ka» относятся к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как подразумевается то, что термин «kdis» или «kd» в том виде, как он используется в данном документе, относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин «KD» в том виде, как он используется в данном документе, относится к константе диссоциации, которую получают из отношения k_d к k_f (т.е. k_d/k_a) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значение KD антитела можно определять с использованием хорошо известных в данной области способов. Способы определения KD антитела включают измерение поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы, такой как система, или измерение аффинности в растворе посредством анализа равновесного титрования раствора (SET).

Антитело «с созревшей аффинностью» представляет собой антитело с одним или более чем одним изменением в его одной или более чем одной CDR, что приводит к улучшению аффинности антитела в отношении антигенов по сравнению с родительским антителом, которое не содержит данных изменений. Предпочтительно в некоторых воплощениях антитело с созревшей аффинностью

имеет наномолярную или даже пикомолярную аффинность в отношении антигена-мишени. Антитела с созревшей аффинностью можно получать с использованием методик, известных в данной области.

«Мутация аминокислоты» охватывает замены, делеции, вставки и модификации аминокислот. Для получения конечной конструкции можно делать любую комбинацию замен, делеций, вставок и модификаций, при условии, что конечная конструкция обладает желательными свойствами. Делеции и вставки аминокислотной последовательности включают аминоконцевые и/или карбоксиконцевые делеции и вставки аминокислот. Конкретные мутации аминокислот могут представлять собой замены аминокислот. В одном воплощении мутации аминокислот представляют собой неконсервативные замены аминокислот – то есть, одна аминокислота заменяется другой аминокислотой, имеющей отличные структурные и/или химические свойства. Замены аминокислот включают замену аминокислотами, не встречающимися в природе, или производными 20 природных аминокислот (например, 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин и 5-гидроксилизин). Мутации аминокислот могут быть получены с использованием хорошо известных в данной области генетических или химических способов. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР (полимеразная цепная реакция), синтез гена и тому подобные. 25 Рассматривается то, что также можно использовать способы изменения групп боковых цепей аминокислот, отличные от генной инженерии, такие как химическая модификация. В данном документе можно использовать разные наименования для указания той же самой мутации аминокислоты.

«Примерно» описанный в данном раскрытии означает то, что он находится в пределах приемлемого интервала ошибки для конкретного значения при определении обычным специалистом в данной области, что отчасти будет зависеть от того, как измеряется или определяется данное значение, т.е. от ограничений системы измерения. В контексте конкретного анализа, результата или воплощения термин «примерно» означает данное значение плюс/минус интервал в пределах 5%, если прямо не утверждается иное в примере или где-нибудь еще в описании изобретения. 30

Термин «буфер» относится к буферу, которые сопротивляется изменениям pH посредством действия его компонентов сопряженной пары кислота-основание. Примеры буферов, которые контролируют pH в подходящем интервале, включают ацетатный, сукцинатный, глюконатный, на основе соли гистидина, оксалатный, 35

лактатный, фосфатный, цитратный, тартратный, фумаратный, глицилглициновый и другие буферы на основе органических кислот.

«Буфер на основе соли гистидина» представляет собой буфер, содержащий ионы гистидина. Примеры буферов на основе соли гистидина включают гистидин-5 гидрохлоридный буфер, гистидин-ацетатный буфер, гистидин-фосфатный буфер, гистидин-сульфатный буфер и тому подобные, и предпочтительными являются гистидин-гидрохлоридный буфер или гистидин-ацетатный буфер. Гистидин-ацетатный буфер получают с гистидином и уксусной кислотой, а гистидин-гидрохлоридный буфер получают с гистидином и гистидина гидрохлоридом, или 10 гистидином и соляной кислотой.

«Цитратный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы цитрата. Примеры цитратных буферов включают лимонную кислоту-цитрат натрия, лимонную кислоту-цитрат калия, лимонную кислоту-цитрат кальция, лимонную кислоту-цитрат магния и тому подобные. Предпочтительный цитратный буфер 15 представляет собой лимонную кислоту-цитрат натрия.

«Сукцинатный буфер» представляет собой буфер, содержащие сукцинатные ионы. Примеры сукцинатных буферов включают янтарную кислоту-сукцинат натрия, янтарную кислоту-сукцинат калия, янтарную кислоту-сукцинат кальция и тому подобные. Предпочтительный сукцинатный буфер представляет 20 собой янтарную кислоту-сукцинат натрия. В качестве иллюстрации, янтарную кислоту-сукцинат натрия можно получать с использованием янтарной кислоты и гидроксида натрия или янтарной кислоты и сукцината натрия.

«Фосфатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы фосфата. Примеры фосфатных буферов включают динатрия гидрофосфат-натрия 25 дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат-калия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат-лимонную кислоту и тому подобные. Предпочтительный фосфатный буфер представляет собой динатрия гидрофосфат-натрия дигидрофосфат.

«Ацетатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ацетатные ионы. Примеры ацетатных буферов включают уксусную кислоту-ацетат натрия, 30 гистидиновую соль уксусной кислоты, уксусную кислоту-ацетат калия, уксусную кислоту-ацетат кальция, уксусную кислоту-ацетат магния и тому подобные. Предпочтительный ацетатный буфер представляет собой уксусную кислоту-ацетат натрия.

Термин «стабилизатор» относится к компоненту, который помогает 35 поддерживать структурную целостность биофармацевтического лекарственного средства, в частности, на протяжении замораживания и/или лиофилизации, и/или

хранения (в частности при подвергании воздействию стресса). Данный стабилизирующий эффект может возникать по целому ряду причин, и типично такие стабилизаторы могут действовать в качестве осмотических агентов, которые уменьшают денатурацию белка. Термин «дополнительный стабилизатор» в данном документе относится к стабилизатору, отличному от буферных систем, 5 поверхностно-активных веществ и сахароспиртов, например, стабилизатор выбран из группы, состоящей из PEG (полиэтиленгликоль), аргинина и EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота).

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей 10 одно или более чем одно описанное в данном документе антители и другие химические компоненты, например, физиологические/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Целью данной фармацевтической композиции является поддержание стабильности активного ингредиента и стимуляция введения в организм, что облегчает поглощение данного активного 15 ингредиента, оказывая, посредством этого, биологическую активность.

Термин «фармацевтическая композиция» и «препарат» в том виде, как они используются в данном документе, не являются взаимоисключающими.

Если не утверждается иное, растворитель в описанной в данном документе фармацевтической композиции в форме раствора представляет собой воду.

20 Термин «лиофилизированный препарат» относится к препарату или фармацевтической композиции, полученной лиофилизацией фармацевтической композиции в форме жидкости или раствора, или препарата в форме жидкости или раствора в вакууме.

В то время как в настоящем раскрытии приводятся интервалы или значения 25 содержимого, обычным специалистам в данной области будет понятно то, что интервалы или значения содержимого охватывают приемлемые интервалы ошибки для конкретных определенных значений.

Для фармацевтической композиции, описанной в данном документе, может достигаться эффект стабильности: фармацевтическая композиция, в которой 30 антители по существу сохраняет его физическую и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность после хранения; предпочтительно данная фармацевтическая композиция по существу сохраняет ее физическую и химическую стабильность, а также ее биологическую активность после хранения. Период хранения обычно выбирают на основе заданного срока хранения 35 фармацевтической композиции. В настоящее время доступен целый ряд аналитических методик для определения стабильности белка, и может быть

определена стабильность после хранения в течение выбранного периода времени при выбранной температуре.

Стабильный препарат представляет собой препарат, в котором не наблюдается значимого изменения при следующих условиях: хранение при температуре охлаждения (2-8°C) в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно 6 месяцев, более предпочтительно 1 года и даже более предпочтительно вплоть до 2 лет. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные характеристики после хранения при температурах, включающих 25°C, в течение периодов, включающих 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев. Типичными примерами для стабильности являются следующие: типично не больше, чем примерно 10%, предпочтительно не больше, чем примерно 5% агрегатов мономеров антитела или деградации при измерении посредством ГФ-ВЭЖХ (гель-фильтрация-высокоэффективная жидкостная хроматография). Данный препарат представляет собой бледно-желтую, почти бесцветную и прозрачную жидкость или бесцветную и прозрачную жидкость, или является от прозрачного до слегка опалесцентного посредством визуального анализа. Концентрация, pH и осмоляльность данного препарата имеют изменение не больше, чем плюс/минус 10%. Типично наблюдается не больше, чем примерно 10%, предпочтительно не больше, чем примерно 5% снижения. Типично образуется не больше, чем примерно 10%, предпочтительно не больше, чем примерно 5% агрегатов.

Антитело «сохраняет его физическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если оно не демонстрирует значимого увеличения агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальной проверке цвета и/или прозрачности, или при определении посредством рассеяния УФ (ультрафиолетовый) света, гель-фильтрации (ГФ) и динамического светорассеяния (ДРС). Изменения конформации белка можно оценивать флуоресцентной спектроскопией (которая определяет третичную структуру белка) и спектроскопией FTIR (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) (которая определяет вторичную структуру белка).

Антитело «сохраняет его химическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если оно не демонстрирует значимого химического изменения. Химическую стабильность можно оценивать посредством выявления и количественного измерения химически измененных форм белка. Процессы деградации, которые часто изменяют химическую структуру белков, включают гидролиз или отрезание (оцениваемые такими способами, как гель-фильтрация или КЭ-ДСН (капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия), окисление

(оцениваемое такими способами, как пептидное картирование в сочетании с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), дезамидирование (оцениваемое такими способами, как ионообменная хроматография, капиллярная
5 изoeлектрофокусировка, пептидное картирование и измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризация (оцениваемая измерением содержания изоаспарагиновой кислоты, пептидным картированием и т.д.).

Антитело «сохраняет его биологическую активность» в фармацевтическом препарате, если биологическая активность данного антитела в данное время
10 находится в пределах заданного интервала биологической активности, демонстрируемой во время получения данного фармацевтического препарата.

«Введение», «подача» и «обработка», при применении в отношении животных, человека, экспериментальных субъектов, клеток, тканей, органов или биологических жидкостей, относится к контакту экзогенного лекарственного
15 средства, терапевтического средства, диагностического средства или композиции с животными, человеком, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. «Введение», «подача» и «обработка» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка
20 клеток включает приведение реактива в контакт с клетками и приведение реактива в контакт с жидкостью, где данная жидкость находится в контакте с клетками. «Введение», «подача» и «обработка» также относятся к обработке, например, клеток реактивами, диагностическими, связывающими композициями или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Осуществление обработки», при применении в
25 отношении человека, ветеринарных или исследовательских субъектов, относится к терапевтической обработке, предупредительным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим приложениям.

«Лечение» относится к введению терапевтического средства, например, содержащего любую из фармацевтических композиций по настоящему раскрытию, либо внутренне, либо наружно пациенту с одним или более чем одним симптомом
30 заболевания, на которое, как известно, данное терапевтическое средство имеет терапевтическое влияние. Обычно данное терапевтическое средство вводят в эффективном количестве для облегчения одного или более чем одного симптома заболевания у пациента или популяции, которую лечат для индукции регрессии
35 таких симптомов или ингибирования развития таких симптомов в любой клинически измеримой степени. Эффективное количество терапевтического средства для

облегчения симптомов любого конкретного заболевания (также известное как «терапевтически эффективное количество») может варьировать, в зависимости от целого ряда факторов, таких как состояние заболевания, возраст и масса пациента, и способность данного лекарственного средства давать желательный терапевтический эффект у пациента. То, был ли облегчен симптом заболевания, можно оценивать любыми способами клинического анализа, обычно используемыми врачами или другими профессионалами в сфере здравоохранения, для оценки тяжести или прогрессирования симптома. Хотя воплощения настоящего раскрытия (например, способы лечения или изделия) и могут быть неэффективными в облегчении симптомов каждого интересующего заболевания, они должны уменьшать симптомы интересующего заболевания у статистически значимого числа пациентов, при определении согласно любым способам статистического анализа, известным в данной области, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (H критерий), критерий Джонкхеера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

В настоящем раскрытии нет ограничения для заболевания, ассоциированного с CTGF, при условии, что оно представляет собой заболевание, ассоциированное с CTGF. Например, терапевтический ответ, индуцированный молекулой по настоящему раскрытию, может достигаться связыванием человеческого CTGF и затем блокированием связывания CTGF с его рецепторами/лигандами или умерщвлением опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих CTGF. Таким образом, молекулы по настоящему раскрытию являются очень полезными при нахождении в подходящих препаратах и композициях для терапевтических применений, для людей, которые имеют опухоли или раковое заболевание, возможно включающее фиброз легкого, фиброз почки, образование и рост опухоли, глаукому, заболевания, связанные с пролиферацией клеток, катаракты, хороидальную неоваскуляризацию, отслойку сетчатки, пролиферативную витреоретинопатию, макулодистрофию, диабетическую ретинопатию, рубцевание роговицы и помутнение роговицы, кисты, пониженный кальциноз сосудов, аденокарциному протока поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, меланому, фиброз, индуцированный радиацией (RIF), идиопатический легочный фиброз и заболевания, связанные с реструктурированием легкого, выбранные из группы, состоящей из астмы, хронического бронхита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ),

кистозного фиброза, эмфиземы и тому подобных, предпочтительно рак поджелудочной железы, легочный фиброз и фиброз почки.

5 Подробности одного или более чем одного воплощения настоящего раскрытия излагаются в приведенном выше описании изобретения. Хотя в воплощении на практике или тестировании настоящего раскрытия и можно использовать любые способы и материалы, аналогичные или идентичные описанным в данном документе способам и материалам, предпочтительные способы и материалы описываются ниже. Другие характеристики, предметы и преимущества настоящего раскрытия будут очевидными из описания и формулы изобретения. В описании и формуле изобретения формы единственного числа 10 включают объекты ссылок во множественном числе, если в контексте явно не указывается иное. Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные обычным специалистам в области, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Все патенты и публикации, процитированные в данном описании изобретения, 15 включаются посредством ссылки. Следующие примеры излагаются для того, чтобы полнее проиллюстрировать предпочтительные воплощения настоящего раскрытия. Данные примеры не следует истолковывать каким-либо способом, как ограничивающие объем настоящего раскрытия, которое определяется формулой изобретения. 20

ПРИМЕРЫ

Настоящее раскрытие дополнительно описывается ниже со ссылкой на 25 примеры, которые, однако, не предназначены для того, чтобы ограничивать объем настоящего раскрытия. Экспериментальные способы в примерах настоящего раскрытия, в которых конкретные условия не определены, обычно осуществляются при традиционных условиях, например, со ссылкой на Antibodies: A Laboratory Manual and Molecular Cloning: A Laboratory Manual by Cold Spring Harbor Laboratory, 30 или при условиях, рекомендованных изготовителем сырья или товаров. Реактивы без конкретных указанных происхождений представляли собой доступные в продаже традиционные реактивы.

I. Антитела

35 **Пример 1-1. Получение антигена CTGF и антител**

I. Конструирование и экспрессия антигена

С человеческим белком CTGF (Genbank No. NM_001901.2) в качестве матрицы конструировали аминокислотные последовательности антигена и белка для анализов; возможно белок CTGF или фрагменты сливали с разными метками. Последовательности клонировали в векторы рТТ5 или векторы рХС и временно экспрессировали в клетках 293 или стабильно экспрессировали в клетках CHO (яичники китайского хомяка) LONZA с получением закодированного антигена и белка для анализов по настоящему раскрытию. Все следующие антигены CTGF являются человеческими CTGF, если не определено иначе.

Человеческий полноразмерный белок CTGF (для иммунизации), SEQ ID NO:

10 1)

QNCSGPCRCPPDEPAPRCPAGVSLVLDGCGCCRVCAKQLGELCTERDPCDPHK
GLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPL
CSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCDEPKDQTVVGPALAAAYRLEDTFGPDPT
MIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIK
15 KGKKCIRTPKISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDGRCCCTPHRTTTLTPVEFKCPDG
EVMKKNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMYGDMA

Для анализов можно использовать CTGF-his (слитый белок зрелого человеческого белка CTGF и his метки), SEQ ID NO: 2

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQNCSGPCRCPPDEPAPRCPAGVSLVLDGCGCCRV
20 CAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCIFGGTVYRSGESFQ
SSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCDEPKDQT
VVGPAALAAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLE
KQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDG
RCCTPHRTTTLTPVEFKCPDGEVMKKNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMYGDM
25 АННННННН

(Примечание: сигнальный пептид подчеркнут одной линией, кодирующая область человеческого CTGF выделена курсивом, и his метка подчеркнута двумя линиями).

Для анализов можно использовать mCTGF-mFc (слитый белок кодирующей области мышинового CTGF и мышиной метки Fc), SEQ ID NO: 3

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQDCSAQCQCAAEAAPHCPAGVSLVLDGCGCCRV
30 CAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCVFGGSVYRSGESF
QSSCKYQCTCLDGAVGCVPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCDEPKDRT
AVGPALAAAYRLEDTFGPDPTMMRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNTFCRLE
35 KQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKIAKPVKFELSGCTSVKTYRAKFCGVCTDG
RCCTPHRTTTLTPVEFKCPDGEIMKKNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMYGDM

AEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
ISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI
ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

- 5 (Примечание: сигнальный пептид подчеркнут одной линией, кодирующая область мышинового CTGF выделена курсивом, и метка mFc подчеркнута двумя линиями).

Мышиный белок CTGF-His метка, SEQ ID NO: 4

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQDCSAQCQCAAEAAPHCPAGVSLVLDGCGCCRV
 10 *CAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCVFGGSVYRSGESF*
QSSCKYQCTCLDGAVGCVPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPKGKCEEWVCDEPKDRT
AVGPALAAAYRLEDTFGPDPTMMRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNTFCRLE
KQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKIAKPVKFELSGCTSVKTYRAKFCGVCTDG
*RCCTPHRTTTL*PVEFKCPDGEIMKKNMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMYGDM
 15 АННННННН

(Примечание: сигнальный пептид подчеркнут одной линией, кодирующая область мышинового CTGF выделена курсивом, и метка his подчеркнута двумя линиями).

- Для анализов может быть использован CTGF-Fc яванского макака (слитый белок кодирующей области CTGF яванского макака и Fc), SEQ ID NO: 5

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQNCSGPCRCPAEQAPRCPAGVSLVLDGCGCCRV
*CAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPC*IFGGTVYRSGESFQ
SSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPKGKCEEWVCDEPKDQT
VVGPALAAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLE
 25 *KQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKISKPIKFELSGCTSVKTYRAKFCGVCTDGR*
*CCTPHRTTTL*PVEFKCPDGEVMKKNMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYYRKMYGDMA
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 30 KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Примечание: сигнальный пептид подчеркнут одной линией, кодирующая область CTGF яванского макака выделена курсивом, и метка Fc подчеркнута двумя линиями).

II. Очистка рекомбинантного белка, ассоциированного с CTGF, и очистка гибридного антитела против человеческого CTGF и рекомбинантного антитела

1. Разделение и очистка супернатанта гибридомы посредством аффинной хроматографии на белке G

Для очистки супернатанта мышинной гибридомы белок G является предпочтительным для аффинной хроматографии. Культивируемую гибридому центрифугировали с получением супернатанта, и добавляли 10-15% по объему 1 М Tris-HCl (pH 8,0-8,5) на основе объема супернатанта для корректировки pH супернатанта до нейтральности. Колонку с белком G промывали 3-5 объемами колонки 6 М гуанидина гидрохлорида, затем 3-5 объемами колонки чистой воды; данную хроматографическую колонку уравнивали 3-5 объемами колонки, например, 1×PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) (pH 7,4); супернатант клеток загружали на колонку при низкой скорости тока для связывания с контролируемой скоростью тока для обеспечения времени удерживания примерно 1 мин или дольше; данную хроматографическую колонку промывали 3-5 объемами колонки 1×PBS (pH 7,4), пока поглощение в УФ не падало обратно до исходного уровня; образец элюировали 0,1 М буфером уксусная кислота/ацетат натрия (pH 3,0), пики элюции отбирали посредством выявления в УФ, и элюированный продукт быстро доводили до pH 5-6 1 М Tris-HCl (pH 8,0). Для элюированного продукта можно осуществлять замену раствора способами, хорошо известными для специалистов в данной области, такими как ультрафильтрационное концентрирование с использованием ультрафильтрационной пробирки для замены раствора на желательную буферную систему, или замена желательной буферной системой посредством гель-фильтрации (например, обессоливание на G-25), или удаление полимерных компонентов из элюированного продукта с использованием гель-фильтрационной колонки высокого разрешения, такой как Superdex 200, для улучшения чистоты образца.

2. Очистка антитела посредством аффинной хроматографии на белке A

Во-первых, супернатант культуры клеток, экспрессирующей антитело, центрифугировали при высокой скорости, и данный супернатант отбирали. Аффинную колонку с белком A промывали 3-5 объемами колонки 6 М гуанидина гидрохлорида, затем 3-5 объемами колонки чистой воды. Данную хроматографическую колонку уравнивали 3-5 объемами колонки, например, 1×PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) (pH 7,4). Супернатант клеток

загружали на колонку при низкой скорости тока для связывания с контролируемой скоростью тока для обеспечения времени удерживания примерно 1 мин или дольше. После завершения связывания данную хроматографическую колонку промывали 3-5 объемами колонки 1×PBS (pH 7,4), пока поглощение в УФ не падало
 5 обратно до исходного уровня. Образец элюировали 0,1 М буфером уксусная кислота/ацетат натрия (pH 3,0-3,5), пики элюции отбирали посредством выявления в УФ, и элюированный продукт быстро доводили до pH 5-6 1 М Tris-HCl (pH 8,0). Для элюированного продукта можно осуществлять замену раствора способами, хорошо известными для специалистов в данной области, такими как
 10 ультрафильтрационное концентрирование с использованием ультрафильтрационной пробирки для замены раствора на желательную буферную систему, или замена желательной буферной системой посредством гель-фильтрации (например, обессоливание на G-25), или удаление полимерных компонентов из элюированного продукта с использованием гель-фильтрационной
 15 колонки высокого разрешения, такой как Superdex 200, для улучшения чистоты образца.

3. Очистка на никелевой колонке человеческого CTGF-his и других рекомбинантных белков, ассоциированных с CTGF

20 Образец супернатанта экспрессии клеток центрифугировали при высокой скорости для удаления примесей, и буфер заменяли PBS, с последующим добавлением имидазола с получением конечной концентрации 5 мМ. Никелевую колонку уравнивали раствором PBS, содержащим 5 мМ имидазол, и промывали 2-5 объемами колонки. Образец супернатанта после замены загружали
 25 на колонку для связывания. В качестве среды могли быть выбраны никелевые колонки от разных компаний. Данную колонку промывали раствором PBS, содержащим 5 мМ имидазол, пока показатель A280 (поглощение при длине волны 280 нм) не падал до исходного уровня. Хроматографическую колонку затем промывали смесью PBS и 10 мМ имидазола для удаления неспецифично
 30 связанных примесных белков, и удаляли элюат. Целевой белок элюировали раствором PBS, содержащим 300 мМ имидазол, и отбирали пики элюции.

После концентрирования отобранный элюированный продукт мог быть дополнительно очищен посредством гель-хроматографии Superdex200 (GE) с PBS в качестве подвижной фазы для удаления агрегатов и пиков примесных белков, и
 35 отбирали пик элюции целевого продукта. Полученный белок идентифицировали электрофорезом, пептидным картированием и ЖХ-МС (жидкостная

хроматография-масс-спектрометрия), затем аликвотировали для его использования позднее, если он был определен как правильный.

4. Очистка человеческого CTGF-Fc, CTGF-Fc яванского макака и других рекомбинантных белков, ассоциированных с CTGF, посредством аффинной хроматографии на белке А

Во-первых, супернатант культуры центрифугировали при высокой скорости, и данный супернатант отбирали. Аффинную колонку с белком А промывали 3-5 объемами колонки 6 М гуанидина гидрохлорида, затем 3-5 объемами колонки чистой воды. Данную хроматографическую колонку уравнивали 3-5 объемами колонки, например, 1×PBS (pH 7,4). Супернатант клеток загружали на колонку при низкой скорости тока для связывания с контролируемой скоростью тока для обеспечения времени удерживания примерно 1 мин или дольше. После завершения связывания данную хроматографическую колонку промывали 3-5 объемами колонки 1×PBS (pH 7,4), пока поглощение в УФ не падало обратно до исходного уровня. Образец элюировали 0,1 М буфером уксусная кислота/ацетат натрия (pH 3,0-3,5), и пик элюции отбирали посредством выявления в УФ.

После концентрирования отобранный элюированный продукт мог быть очищен далее посредством гель-хроматографии Superdex200 (GE) с PBS в качестве подвижной фазы для удаления агрегатов и пиков примесных белков, и отбирали пик элюции целевого продукта. Полученный белок идентифицировали электрофорезом, пептидным картированием и ЖХ-МС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия), затем аликвотировали для использования позднее, если он был определен как правильный.

Пример 1-2. Получение моноклональных антител против человеческого CTGF

I. Иммунизация

Моноклональные антитела против человеческого CTGF получали иммунизацией мышей. Лабораторные белые мыши SJL, самки, в возрасте 6-8 недель (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., номер лицензии на производство животных: SCXK(Beijing)2012-0001). Среда для содержания: SPF. Приобретенных мышей содержали в лабораторной среде в течение 1 недели при циклах 12/12 часов света/темноты, при температуре 20-25°C с влажностью 40-60%.

Акклиматизированных мышей иммунизировали согласно следующей схеме. Иммунные антигены представляли собой CTGF (R&D) и mCTGF-mFc.

Схема иммунизации: мышей иммунизировали белком CTGF в количестве 25 мкг/мышь/время посредством внутрибрюшинной инъекции. В сутки 0 каждой мыши
 5 внутрибрюшинно (в.б.) инъектировали 100 мкл, и вводили бустерную иммунизацию каждые 14 суток. Кровь отбирали в сутки 21, 35, 49 и 63, и титр антитела в мышинной сыворотке определяли посредством ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ). После 7-9 иммунизаций мышей, у которых титр антитела в сыворотке был высоким и достигал плато, отбирали для слияния
 10 спленоцитов. Бустерную иммунизацию проводили за 3 суток до слияния спленоцитов, и раствор белка-антигена CTGF в нормальном физиологическом растворе внутрибрюшинно (в.б.) инъектировали в количестве 25 мкг/мышь.

II. Слияние спленоцитов

Лимфоциты селезенки и миеломные клетки Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) сливали, следуя методике слияния, опосредованного PEG (полиэтиленгликоль), с получением гибридных клеток. Образующиеся гибридные клетки ресуспендировали в полной среде (среда IMDM, содержащая 20% FBS (фетальная телячья сыворотка), 1× HAT и 1× OPI) при плотности $0,5-1 \times 10^6$ /мл и высевали в
 20 96-луночный планшет в объеме 100 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 3-4 суток, дополняли полной средой HAT в объеме 100 мкл/лунку и инкубировали в течение еще 3-4 суток с образованием клонов, подобных острию булавки. Супернатант удаляли, и добавляли полную среду HT (среда IMDM (среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков),
 25 содержащая 20% FBS, 1× HT и 1× OPI) в объеме 200 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 3 суток, с последующим анализом ELISA.

III. Скрининг гибридных клеток

Супернатанты культуры гибридомы анализировали способом связывающего ELISA согласно плотности роста гибридных клеток. Затем супернатанты клеток из позитивных лунок, при определении посредством связывающего ELISA, подвергали эксперименту по связыванию с использованием обезьяньего CTGF/мышинного CTGF/человеческого CTGF белков (с использованием того же
 35 самого способа, что и в Примере 3). Клетки из позитивных лунок, при определении

посредством эксперимента ELISA по связыванию белка, размножали, своевременно криоконсервировали и субклонировали 2-3 раза, пока не получали клоны одиночных клеток.

Анализ ELISA по связыванию CTGF также проводили для каждого субклонирования клеток. Гибридомные клоны получали вышеописанным способом скрининга, и далее получали антитела с использованием способа культивирования клеток без сыворотки. Антитела очищали согласно примеру очистки для применения в примерах анализа.

10 IV. Секвенирование гибридных позитивных клонов

Клонирование последовательностей из позитивных гибридом осуществляется следующим образом. Отбирали гибридомные клетки в логарифмической фазе роста, выделяли РНК с использованием Trizol (Invitrogen, кат. № 15596-018), следуя методикам в инструкциях набора, и осуществляли обратную транскрипцию с использованием набора обратной транскриптазы PrimeScript™ (Takara, кат. № 2680A). кДНК, полученную обратной транскрипцией, амплифицировали посредством ПЦР с использованием набора праймеров для мышиного Ig (Novagen, TB326 Rev.B 0503), и затем продукты амплификации выслали в секвенирующую компанию для секвенирования. Аминокислотные последовательности переменных областей мышиных антител против CTGF mab147, mab164 и mab95, полученных секвенированием, являются следующими:

Аминокислотная последовательность VH mab147 изложена в SEQ ID NO: 6,
 EVQLVESGGGLVQPEGSLKLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR
 TKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMYLYQMNNLKTEDTAMYYCVETGFAYWDQGT
 25 LVTVSA

Аминокислотная последовательность VL mab147 изложена в SEQ ID NO: 7,
 QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLAS
 GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK

Аминокислотная последовательность VH mab164 изложена в SEQ ID NO: 8,
 30 QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTFGVHWIRQSPGKGLEWLGVIWR
 RGGTDYNAAFMSRLSITKDNSRSHVFFKMTSLQTDSDAIYYCARDGGGFDYWGQGTTLT
 VSS

Аминокислотная последовательность VL mab164 изложена в SEQ ID NO: 9,
 QAVVTQESALTTSPGGTVILTCRSSIGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTSN
 35 RAPGVPRFSGSLIGDKAALTITGAQAEDDAMYFCALWYSTHYVFGGGTKVTVL

Аминокислотная последовательность VH mab95 изложена в SEQ ID NO: 69,

*EVLLQQSGPVLVKPGPSVKISCKASGFTFTNYDIHWVKQSHGKSLEWIGLVYPY
NGGTAYNQKFKDKATLTFTDSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARWGLIPGTTSYFDVW
GTGTTVTVSS*

Аминокислотная последовательность VL mab95 изложена в SEQ ID NO: 70,
5 *QIVLSQSPPILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQQKPRSSPKPWIYATSNLAS
GVPARFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPWTFGGGTRLEIK*

В последовательностях вариабельной области антител mab147, mab164 и
mab95 последовательности FR выделены курсивом, последовательности CDR
подчеркнуты и выделены курсивом, и порядок последовательности представляет
10 собой FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности областей CDR тяжелой и легкой цепей антител против CTGF*

Антитело	Тяжелая цепь		Легкая цепь	
mab147	HCDR1	TYAMN SEQ ID NO: 10	LCDR1	SASSSVSYM SEQ ID NO: 13
	HCDR2	RIRTKSNYYATYYADSVKD SEQ ID NO: 11	LCDR2	STSNLAS SEQ ID NO: 14
	HCDR3	TGFAY SEQ ID NO: 12	LCDR3	QQRSSYPLT SEQ ID NO: 15
mab164	HCDR1	TFGVH SEQ ID NO: 16	LCDR1	RSSIGAVTTSNYAN SEQ ID NO: 19
	HCDR2	VIWRRGGTDYNAAFMS SEQ ID NO: 17	LCDR2	GTSNRAP SEQ ID NO: 20
	HCDR3	DGGFDY SEQ ID NO: 18	LCDR3	ALWYSTHYV SEQ ID NO: 21
mab95	HCDR1	NYDIH SEQ ID NO: 71	LCDR1	RASSSVSYIH SEQ ID NO: 74
	HCDR2	LVYPYNGGTAYNQKFKD SEQ ID NO: 72	LCDR2	ATSNLAS SEQ ID NO: 75
	HCDR3	WGLIPGTTSYFDV SEQ ID NO: 73	LCDR3	QQWNSNPWT SEQ ID NO: 76

* CDR в таблице определяются посредством схемы нумерации Kabat.

15

V. Получение человеческих химерных антител IgG1

Кодирующие последовательности гена вариабельной области могли быть
получены амплификацией и секвенированием молекул-кандидатов mab147,
mab164 и mab95, праймер голова-хвост конструировали с использованием
20 последовательностей, полученных секвенированием, фрагмент гена VH/VK
конструировали для каждого антитела посредством ПЦР с использованием
секвенированного гена в качестве матрицы и гомологично рекомбинировали с

экспрессионным вектором pHr (с сигнальным пептидом и геном константной области hlgG1/hkappa/hlambdа (CH1-Fc/CL)) с конструированием полноразмерной экспрессионной плазмиды рекомбинантного химерного антитела VH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHr и с образованием трех химерных антител: Ch147, Ch164 и Ch95.

5

VI. Гуманизация мышинных антител против человеческого CTGF

Посредством сравнения базы данных генов зародышевой линии переменных областей тяжелой и легкой цепей человеческого антитела IMGT (<http://imgt.cines.fr>) с программой MOE (молекулярная операционная среда) отбирали гены зародышевой линии переменных областей тяжелой и легкой цепей с высокой гомологией с мышинными антителами в качестве матриц, и CDR мышинных антител прививали на соответствующие гуманизированные матрицы с образованием последовательностей переменной области в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

15

1. Гуманизация mab147

Матрицы гуманизации легкой цепи для мышинного антитела mab147 представляют собой IGKV3-11*01 и IGKJ2*01 или IGKV1-39*01 и IGKJ2*01, и матрицы гуманизации тяжелой цепи представляют собойIGHV3-72*01 и IGHJ1*01. CDR мышинного антитела mab147 прививали на его гуманизированные матрицы, и далее модифицировали обратными мутациями некоторые аминокислоты FR гуманизированного антитела, где обратные мутации переменных областей легкой цепи включают одну или более чем одну из 4L, 36F, 43S, 45K, 47W, 58V и 71Y, и обратные мутации переменных областей тяжелой цепи включают одну или более чем одну из 28S, 30N, 49A, 75E, 76S, 93V, 94E и 104D (положения обратных мутаций в переменных областях легкой и тяжелой цепи определяются схемой нумерации Kabat); получали переменные области легкой и тяжелой цепи с разными последовательностями. Таким образом, получали гуманизированное антитело, содержащее CDR mab147, и его последовательности переменной области являются следующими:

30

Конкретные последовательности переменных областей гуманизированного антитела mAb147 являются следующими:

Аминокислотная последовательность Hu147-VL1 изложена в SEQ ID NO: 22:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPRLLIYSTSNLA

35

SGIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIK

Аминокислотная последовательность Hu147-VL2 изложена в SEQ ID NO: 23:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPKLLIYSTSNLAS
GIPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGGTKLEIK

Аминокислотная последовательность Hu147-VL3 изложена в SEQ ID NO: 24:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPKLWIYSTSNLA
 5 *SGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGGTKLEIK*

Аминокислотная последовательность Hu147-VL4 изложена в SEQ ID NO: 25:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLLIYSTSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGGTKLEIK

Аминокислотная последовательность Hu147-VL5 изложена в SEQ ID NO: 26:

10 *DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLWIYSTSNLA*
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGGTKLEIK

Аминокислотная последовательность Hu147-VH1 изложена в SEQ ID NO: 27:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIR
TKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT
 15 *LVT*VSS

Аминокислотная последовательность Hu147-VH2 изложена в SEQ ID NO: 28:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR
TKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT
*LVT*VSS

20 Аминокислотная последовательность Hu147-VH3 изложена в SEQ ID NO: 29:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR
TKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESSLYQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT
*LVT*VSS.

Примечание: последовательности CDR, определенные по схеме нумерации

25 Kabat, подчеркнуты, и порядок является следующим: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-
 CDR3-FR4.

2. Гуманизация mab164

Матрица гуманизации легкой цепи для мышинового антитела mab164 состоит
 30 из IGLV7-43*01 и IGLJ2*01, IGLV8-61*01 и IGLJ2*01 или IGLV1-40*02 и IGLJ2*01, и
 матрица гуманизации тяжелой цепи состоит из IGHV2-26*01 и IGHJ6*01 или IGHV4-
 31*02 и IGHJ6*01. CDR мышинового антитела mab164 прививали на его
 гуманизированные матрицы, и далее модифицировали обратными мутациями
 некоторые аминокислоты FR гуманизированного антитела, где обратные мутации
 35 вариабельных областей легкой цепи включают одну или более чем одну из 36V,

44F, 46G и 49G, и обратные мутации переменных областей тяжелой цепи включают одну или более чем одну из 44G, 49G, 27F, 48L, 67L, 71K, 78V и 80F (положения обратных мутаций в переменных областях легкой и тяжелой цепи определяются схемой нумерации Kabat); таким образом, получали тяжелую цепь гуманизированного антитела и легкую цепь гуманизированного антитела mAb164, и его последовательности переменных областей являются следующими:

Конкретные последовательности переменных областей гуманизированного антитела mAb164 являются следующими:

Аминокислотная последовательность Hu164-VL7 изложена в SEQ ID NO: 30:

10 ETVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTS
NRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSTHYVFGGGTKLTVL

Аминокислотная последовательность Hu164-VL8 изложена в SEQ ID NO: 31:

ETVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTS
NRAPGVDPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSTHYVFGGGTKLTVL

15 Аминокислотная последовательность Hu164-VL9 изложена в SEQ ID NO: 32:

ESVVTQPPSVSGAPGQRVTISCRSSIGAVTTSNYANWVQQLPGTAFKGLIGGTS
NRAPGVDPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCALWYSTHYVFGGGTKLTVL

Аминокислотная последовательность Hu164-VH5 изложена в SEQ ID NO: 33:

20 EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKALEWLAVIWR
GGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARDGGGFDYWGQGTTVT
VSS

Аминокислотная последовательность Hu164-VH6 изложена в SEQ ID NO: 34:

25 EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKGLEWLGVWR
GGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVFMTNMDPVDATYYCARDGGGFDYWGQGTTVT
VSS

Аминокислотная последовательность Hu164-VH7 изложена в SEQ ID NO: 35:

EVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWIGVIWR
GGTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGGGFDYWGQGTTVT
SS

30 Аминокислотная последовательность Hu164-VH8 изложена в SEQ ID NO: 36:

EVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWLGVWR
RGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKNQVSFKLSSVTAADTAVYYCARDGGGFDYWGQGTTVT
VSS.

35 Примечание: в приведенных выше последовательностях антитела Hu164 последовательности CDR подчеркнуты, и порядок является следующим: FR1-

CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где данные последовательности CDR определены по схеме нумерации Kabat.

3. Гуманизация mab95

5 Матрицы гуманизации легкой цепи для мышинового антитела mab95 представляют собой IGKV3-20*02 и IGKV1-40*01, и матрицы гуманизации тяжелой цепи представляют собой IGHV1-3*01. CDR мышинового антитела mab95 прививали на его гуманизированные матрицы, и далее модифицировали обратными мутациями некоторые аминокислоты FR гуманизированного антитела, где
10 обратные мутации для переменных областей легкой цепи включают одну или более чем одну из 45P, 46W, 48Y, 69S и 70Y, и обратные мутации переменных областей тяжелой цепи включают одну или более чем одну из 27F, 38K, 48I, 67K, 68A, 70L и 72F (положения обратных мутаций в переменных областях легкой и тяжелой цепи определяются схемой нумерации Kabat); получали переменные области легкой и тяжелой цепи с разными последовательностями. Таким образом,
15 получали гуманизированное антитело, содержащее CDR mab95, и его последовательности переменной области являются следующими:

Конкретные последовательности переменных областей гуманизированного антитела mAb95 являются следующими:

20 Аминокислотная последовательность Hu95-VL1 изложена в SEQ ID NO: 77:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWYQQKPGQAPRPWIYATSNLA
SGIPARFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Аминокислотная последовательность Hu95-VL2 изложена в SEQ ID NO: 78:

25 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWYQQKPGQSPRPWIYATSNLA
SGVPARFSGSGSGTSTYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Аминокислотная последовательность Hu95-VL3 изложена в SEQ ID NO: 79:

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCRASSSVSYIHWYQQLPGTAPKPWIYATSNLAS
GVPDRFSGSKSGTSTYSLAITGLQAEDEADYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Аминокислотная последовательность Hu95-VL4 изложена в SEQ ID NO: 80:

30 EIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCRASSSVSYIHWYQQLPGTSPKPWIYATSNLAS
GVPDRFSGSKSGTSTYSLAITGLQAEDEADYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Аминокислотная последовательность Hu95-VH1 изложена в SEQ ID NO: 81:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWMGLVY
PYNGGTAYNQKFKDRVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFD
35 VWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность Hu95-VH2 изложена в SEQ ID NO: 82:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWIGLVYP
YNGGTAYNQKFKDRATLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDV
 WGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность Hu95-VH3 изложена в SEQ ID NO: 83:

5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWMGLVYPYNGG
TAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVS
 S

Аминокислотная последовательность Hu95-VH4 изложена в SEQ ID NO: 84:

10 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWIGLVYP
YNGGTAYNQKFKDKATLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDV
 WGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность Hu95-VH5 изложена в SEQ ID NO: 85:

15 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGFTFTNYAIHWVKQAPGQRLEWMGLVY
PYTGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGMIPGTNSYFD
VWGQGTTVTVSS.

Примечание: последовательности CDR, определенные по схеме нумерации Kabat, подчеркнуты, и порядок является следующим: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

20 Области CDR Hu95-VH5 были дополнительно модифицированы. HCDR1 изложена в SEQ ID NO: 102 (NYAIH), HCDR2 изложена в SEQ ID NO: 103 (LVYPYTGGTAYNQKFKD), и HCDR3 изложена в SEQ ID NO: 104 (WGMIPGTNSYFDV).

25 4. Конструирование и экспрессия гуманизированных полноразмерных антител против CTGF

Разрабатывали праймер, и затем конструировали фрагмент гена VH/VL каждого гуманизированного антитела посредством ПЦР и подвергали гомологичной рекомбинации с экспрессионным вектором pHr (с сигнальным пептидом и фрагментом гена константной области (CH/CL)), конструируя, таким
 30 образом, экспрессионный вектор VH-CH -pHr/VL-CL-pHr для полноразмерного антитела. Константная область гуманизированного антитела может быть выбрана из группы, состоящей из константных областей легкой цепи человеческих цепей κ и λ , и из группы, состоящей из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и их вариантов. Неограничивающие примеры включают оптимизацию
 35 константных областей человеческих IgG1, IgG2 и IgG4 для улучшения функции антитела; например, период полувыведения антитела может быть пролонгирован

посредством точечных мутаций M252Y/S254T/T256E ("YTE") в константной области, S228P, F234A, L235A и других точечных мутаций в константной области, и тому подобных.

5 Типичные последовательности константной области гуманизированного антитела против CTGF являются следующими:

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 37 (w прибавляется к концу названия образованной тяжелой цепи полноразмерного антитела):

10 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи антитела, модифицированного YTE, изложена в SEQ ID NO: 38 (y прибавляется к концу названия образованной тяжелой цепи полноразмерного антитела):

20 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа гуманизированного антитела против CTGF изложена в SEQ ID NO: 39 (k прибавляется к концу названия образованной тяжелой цепи полноразмерного антитела):

30 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи ламбда гуманизированного антитела против CTGF изложена в SEQ ID NO: 40 (l прибавляется к концу названия образованной тяжелой цепи полноразмерного антитела):

35 GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVE
TTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

- Полноразмерные гуманизированные антитела, происходящие от mab147, образованные связыванием вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела с константной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 37, и связыванием вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела с константной областью легкой цепи каппа, изложенной в SEQ ID NO: 39, включают следующие:

Таблица 6

	Hu147-VL1	Hu147-VL2	Hu147-VL3	Hu147-VL4	Hu147-VL5
Hu147-VH1	Hu147-11wk	Hu147-12wk	Hu147-13wk	Hu147-14wk	Hu147-15wk
Hu147-VH2	Hu147-21wk	Hu147-22wk	Hu147-23wk	Hu147-24wk	Hu147-25wk
Hu147-VH3	Hu147-31wk	Hu147-32wk	Hu147-33wk	Hu147-34wk	Hu147-35wk

- Полноразмерные гуманизированные антитела, происходящие от mab147, образованные связыванием вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела с константной областью тяжелой цепи варианта YTE, изложенного в SEQ ID NO: 38, и связыванием вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела с константной областью легкой цепи каппа, изложенной в SEQ ID NO: 39, включают следующие:

Таблица 7

	Hu147-VL1	Hu147-VL2	Hu147-VL3	Hu147-VL4	Hu147-VL5
Hu147-VH1	Hu147-11yk	Hu147-12yk	Hu147-13yk	Hu147-14yk	Hu147-15yk
Hu147-VH2	Hu147-21yk	Hu147-22yk	Hu147-23yk	Hu147-24yk	Hu147-25yk
Hu147-VH3	Hu147-31yk	Hu147-32yk	Hu147-33yk	Hu147-34yk	Hu147-35yk

- Полноразмерные гуманизированные антитела, происходящие от mab164, образованные связыванием вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела с константной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 37, и связыванием вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела с константной областью легкой цепи лямбда, изложенной в SEQ ID NO: 40, включают следующие:

Таблица 8

	Hu164-VH5	Hu164-VH6	Hu164-VH7	Hu164-VH8
Hu164-VL7	Hu164-57wl	Hu164-67wl	Hu164-77wl	Hu164-87wl
Hu164-VL8	Hu164-58wl	Hu164-68wl	Hu164-78wl	Hu164-88wl

Hu164-VL9	Hu164-59wl	Hu164-69wl	Hu164-79wl	Hu164-89wl
-----------	------------	------------	------------	------------

- Полноразмерные гуманизированные антитела, происходящие от mab164, образованные связыванием вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела с константной областью тяжелой цепи варианта YTE, изложенного в SEQ ID NO: 38, и связыванием вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела с константной областью легкой цепи лямбда, изложенной в SEQ ID NO: 40, включают следующие:

Таблица 9

	Hu164-VH5	Hu164-VH6	Hu164-VH7	Hu164-VH8
Hu164-VL7	Hu164-57yl	Hu164-67yl	Hu164-77yl	Hu164-87yl
Hu164-VL8	Hu164-58yl	Hu164-68yl	Hu164-78yl	Hu164-88yl
Hu164-VL9	Hu164-59yl	Hu164-69yl	Hu164-79yl	Hu164-89yl

- Полноразмерные гуманизированные антитела, происходящие от mab95, образованные связыванием вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела с константной областью тяжелой цепи, изложенной в SEQ ID NO: 37, и связыванием вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела с константной областью легкой цепи каппа, изложенной в SEQ ID NO: 39, включают следующие:

Таблица 10

	Hu95-VH1	Hu95-VH2	Hu95-VH3	Hu95-VH4	Hu95-VH5
Hu95-VL1	Hu95-11wk	Hu95-21wk	Hu95-31wk	Hu95-41wk	Hu95-51wk
Hu95-VL2	Hu95-12wk	Hu95-22wk	Hu95-32wk	Hu95-42wk	Hu95-52wk
Hu95-VL3	Hu95-13wk	Hu95-23wk	Hu95-33wk	Hu95-43wk	Hu95-53wk
Hu95-VL4	Hu95-14wk	Hu95-24wk	Hu95-34wk	Hu95-44wk	Hu95-54wk

- Полноразмерные гуманизированные антитела, происходящие от mab95, образованные связыванием вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела с константной областью тяжелой цепи варианта YTE, изложенного в SEQ ID NO: 38, и связыванием вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела с константной областью легкой цепи каппа, изложенной в SEQ ID NO: 39, включают следующие:

Таблица 11

	Hu95-VH1	Hu95-VH2	Hu95-VH3	Hu95-VH4	Hu95-VH5
Hu95-VL1	Hu95-11yk	Hu95-21yk	Hu95-31yk	Hu95-41yk	Hu95-51yk
Hu95-VL2	Hu95-12yk	Hu95-22yk	Hu95-32yk	Hu95-42yk	Hu95-52yk
Hu95-VL3	Hu95-13yk	Hu95-23yk	Hu95-33yk	Hu95-43yk	Hu95-53yk
Hu95-VL4	Hu95-14yk	Hu95-24yk	Hu95-34yk	Hu95-44yk	Hu95-54yk

Аминокислотные последовательности типичных полноразмерных антител против CTGF являются следующими:

Таблица 12. Легкие или тяжелые цепи полноразмерных антител

Легкие или тяжелые цепи полноразмерных антител (SEQ ID NO)	Аминокислотная последовательность
тяжелая цепь Ch147 (SEQ ID NO: 41)	<i>EVQLVESGGGLVQP<u>EGSLKL</u>SCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRTKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVETGFAYWDQGT</i> <u>LVTV</u> SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
легкая цепь Ch147 (SEQ ID NO: 42)	<i>QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIY</i> <u>STSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLEL</u> KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Полноразмерные тяжелые цепи гуманизированных антител Hu147-11wk, Hu147-12wk, Hu147-13wk, Hu147-14wk и Hu147-15wk (SEQ ID NO: 43)	<i>EVQLVESGGGLVQP<u>GGSLRL</u>SCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGK GLEWVGRIIRTKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT</i> <u>LVTV</u> SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи гуманизированных антител Hu147-21wk, Hu147-22wk, Hu147-23wk,	<i>EVQLVESGGGLVQP<u>GGSLRL</u>SCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRTKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT</i> <u>LVTV</u> SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

Hu147-24wk и Hu147-24wk (SEQ ID NO: 44)	DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Полноразмерные тяжелые цепи гуманизирован- ных антител Hu147-31wk, Hu147-32wk, Hu147-33wk, Hu147-34wk и Hu147-35wk (SEQ ID NO: 45)	<i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRTKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSESSLYLQMNSL KTEDTAVYYCVETGFAYWDQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK</i>
Полноразмерные тяжелые цепи гуманизирован- ных антител Hu147-11yk, Hu147-12yk, Hu147-13yk, Hu147-14yk и Hu147-15yk (SEQ ID NO: 46)	<i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGK GLEWVGRIRTKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSL KTEDTAVYYCVETGFAYWDQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K</i>
Полноразмерные тяжелые цепи гуманизирован- ных антител Hu147-21yk, Hu147-22yk, Hu147-23yk, Hu147-24yk и Hu147-24yk (SEQ ID NO: 47)	<i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRTKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSL KTEDTAVYYCVETGFAYWDQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K</i>
Полноразмерные тяжелые цепи гуманизирован- ных антител Hu147-31yk, Hu147-32yk, Hu147-33yk, Hu147-34yk и Hu147-35yk (SEQ ID NO: 48)	<i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRTKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSESSLYLQMNSL KTEDTAVYYCVETGFAYWDQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K</i>
Полноразмерные легкие цепи гуманизирован- ных антител Hu147-11wk,	<i>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPRL LIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRS SYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>

Hu147-21wk и Hu147-31wk (SEQ ID NO: 49)	(это также полноразмерные легкие цепи Hu147-11yk, Hu147-21yk и Hu147-31yk)
Полноразмерные легкие цепи гуманизированных антител Hu147-12wk, Hu147-22wk и Hu147-32wk (SEQ ID NO: 50)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPKLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRS</u> <u>SYPLTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS</u> <u>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (это также полноразмерные легкие цепи Hu147-12yk, Hu147-22yk и Hu147-32yk)
Полноразмерные легкие цепи гуманизированных антител Hu147-13wk, Hu147-23wk и Hu147-33wk (SEQ ID NO: 51)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQR</u> <u>SSYPLTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (это также полноразмерные легкие цепи Hu147-13yk, Hu147-23yk и Hu147-33yk)
Полноразмерные легкие цепи гуманизированных антител Hu147-14wk, Hu147-24wk и Hu147-34wk (SEQ ID NO: 52)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQR</u> <u>SSYPLTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (это также полноразмерные легкие цепи Hu147-14yk, Hu147-24yk и Hu147-34yk)
Полноразмерные легкие цепи гуманизированных антител Hu147-15wk, Hu147-25wk и Hu147-35wk (SEQ ID NO: 53)	<u>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQR</u> <u>SSYPLTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLS</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (это также полноразмерные легкие цепи Hu147-15yk, Hu147-25yk и Hu147-35yk)
Тяжелая цепь Ch164 (SEQ ID NO: 54)	<u>QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTFGVHWIRQSPGKGL</u> <u>EWLGVIWRRGGTDYNAAFMSRLSITKDNSRSHVFFKMTSLQTD</u> <u>SAIYYCARDGGFDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> <u>GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</u> <u>CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
легкая цепь Ch164 (SEQ ID NO: 55)	<u>QAVVTQESALTTSPGGTVILTCRSSIGAVTTSNYANWVQEKPDHL</u> <u>FTGLIGGTSNRAAGVPVRFSGSLIGDKAALTITGAQAEDDAMYFC</u> <u>ALWYSTHYVFGGGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATL</u> <u>VCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASS</u> <u>YLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC</u>
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-57wl,	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTTFGVHWIRQPPGKALE</u> <u>WLAVIWRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVD</u> <u>ATYYCARDGGFDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u>

Hu164-58wl и Hu164-59wl (SEQ ID NO: 56)	GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-67wl, Hu164-68wl и Hu164-69wl (SEQ ID NO: 57)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVFTMTNMDPVD</u> <u>TATYYCARDGGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-77wl, Hu164-78wl и Hu164-79wl (SEQ ID NO: 58)	<u>EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGL</u> <u>EWIGVIWRRGGTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADT</u> <u>AVYYCARDGGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-87wl, Hu164-88wl и Hu164-89wl (SEQ ID NO: 59)	<u>EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGL</u> <u>EWLGVIWRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKNQVSFKLSSVTAADT</u> <u>AVYYCARDGGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-57yl, Hu164-58yl и Hu164-59yl (SEQ ID NO: 60)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKALE</u> <u>WLAVIWRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVD</u> <u>ATYYCARDGGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-67yl, Hu164-68yl и Hu164-69yl (SEQ ID NO: 61)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVFTMTNMDPVD</u> <u>TATYYCARDGGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVDVSHED

	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-77yl, Hu164-78yl и Hu164-79yl (SEQ ID NO: 62)	<i>EVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGFSIS</i> <u>TFGVHWIRQHPGKGL</u> <i>EWIGVIWRRGGTDYNAAFMS</i> <u>RV</u> <i>TISKDTSKNQVSLKLSSVTAADT</i> <i>AVYYCARDGGFDYWGQGTTVT</i> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <i>GTAALGCLVKDYFPEPVT</i> <u>SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <i>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP</i> <i>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEV</i> <i>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG</i> <i>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</i> <i>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLY</i> <i>SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
Полноразмерные тяжелые цепи Hu164-87yl, Hu164-88yl и Hu164-89yl (SEQ ID NO: 63)	<i>EVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGFSIS</i> <u>TFGVHWIRQHPGKGL</u> <i>EWLGVIWRRGGTDYNAAFMS</i> <u>R</u> <i>L</i> <u>TISKDTSKNQVSFKLSSVTAADT</u> <i>AVYYCARDGGFDYWGQGTTVT</i> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <i>GTAALGCLVKDYFPEPVT</i> <u>SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <i>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP</i> <i>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEV</i> <i>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG</i> <i>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</i> <i>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLY</i> <i>SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
Полноразмерные легкие цепи Hu164-57wl, Hu164-67wl, Hu164-77wl и Hu164-87wl (SEQ ID NO: 64)	<i>ETVVTQEP</i> <u>SLTVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQKPGQ</u> <i>AFRGLIGGTSNRAPWTPARFSGSLLGGKAAL</i> <u>TL</u> <i>SGVQPEDEAEY</i> <i>YCALWYSTHYVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANK</i> <i>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAA</i> <i>SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC</i> (это также полноразмерные легкие цепи Hu164-57yl, Hu164-67yl, Hu164-77yl и Hu164-87yl)
Полноразмерные легкие цепи Hu164-58wl, Hu164-68wl, Hu164-78wl и Hu164-88wl (SEQ ID NO: 65)	<i>ETVVTQEP</i> <u>SFVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQTPGQ</u> <i>AFRGLIGGTSNRAPGV</i> <u>PDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES</u> <i>YY</i> <i>CALWYSTHYVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKAT</i> <i>LVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAA</i> <i>SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC</i> (это также полноразмерные легкие цепи Hu164-58yl, Hu164-68yl, Hu164-78yl и Hu164-88yl)
Полноразмерные легкие цепи Hu164-59wl, Hu164-69wl, Hu164-79wl и Hu164-89wl (SEQ ID NO: 66)	<i>ESVVTQPPSVSGAPGQR</i> <u>V</u> <i>TISCRSSIGAVTTSNYANWVQQLP</i> <u>GT</u> <i>AFKGLIGGTSNRAPGV</i> <u>PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD</u> <i>YY</i> <i>CALWYSTHYVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKAT</i> <i>LVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAA</i> <i>SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC</i> (это также полноразмерные легкие цепи Hu164-59yl, Hu164-69yl, Hu164-79yl и Hu164-89yl)
Тяжелая цепь Ch95 (SEQ ID NO: 86)	<i>EVLLQQSGPVLVKPGPSVKISCKASGFTFT</i> <u>NYDIHWVKQSHGKSL</u> <i>EWIGLVYPYNGGTAYNQKFKDKATL</i> <u>TFD</u> <i>TSSSTAYMELNSLTSED</i> <i>SAVYYCARWGLIPGTT</i> <u>SYFDVWGTGTTVT</u> <i>VSSASTKGPSVFPLAP</i> <i>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</i> <u>SVWNSGALTSGVHTFPAVL</u> <i>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS</i> <i>CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV</i> <i>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</i> <i>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</i>

	SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
легкая цепь Ch95 (SEQ ID NO: 87)	<u>QIVLSQSPPILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQQKPRSSPKP</u> <u>WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ</u> <u>WNSNPWTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL</u> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-11wk, Hu95- 12wk, Hu95-13wk и Hu95-14wk (SEQ ID NO: 88)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQR LEWMGLVYPYNGGTAYNQKFKDRVLTFTDTSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-21wk, Hu95- 22wk, Hu95-23wk и Hu95-24wk (SEQ ID NO: 89)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQR LEWIGLVYPYNGGTAYNQKFKDRATLTFTDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-31wk, Hu95- 32wk, Hu95-33wk и Hu95-34wk (SEQ ID NO: 90)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQR LEWMGLVYPYNGGTAYNQKFKDKVLTFTDTSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-41wk, Hu95- 42wk, Hu95-43wk и Hu95-44wk (SEQ ID NO: 91)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQR LEWIGLVYPYNGGTAYNQKFKDKATLTFTDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-51wk, Hu95- 52wk, Hu95-53wk и Hu95-54wk (SEQ ID NO: 92)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGFTFTNYAIHWVKQAPGQR LEWMGLVYPYTGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARWGMIPGTNSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-11yk, Hu95- 12yk, Hu95-13yk и Hu95-14yk (SEQ ID NO: 93)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQR LEWMGLVYPYNGGTAYNQKFKDRVTLTFDTSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-21yk, Hu95- 22yk, Hu95-23yk и Hu95-24yk (SEQ ID NO: 94)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQR LEWIGLVYPYNGGTAYNQKFKDRATLTFDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-31yk, Hu95- 32yk, Hu95-33yk и Hu95-34yk (SEQ ID NO: 95)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQR LEWMGLVYPYNGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-41yk, Hu95- 42yk, Hu95-43yk и Hu95-44yk (SEQ ID NO: 96)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQR LEWIGLVYPYNGGTAYNQKFKDKATLTFDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGLIPGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV

	LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
Полноразмерные тяжелые цепи Hu95-51yk, Hu95- 52yk, Hu95-53yk и Hu95-54yk (SEQ ID NO: 97)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGFTFTNYAIHWVKQAPGQR</u> <u>LEWMGLVYPYTGGTAYNQKF</u> <u>DKVTLTFDTSASTAYMELSSLRS</u> <u>EDTAVYYCARWGMIPGTNSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP</u> LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP VLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Полноразмерные легкие цепи Hu95- 11wk, Hu95-21wk, Hu95-31wk, Hu95- 41wk и Hu95-51wk (SEQ ID NO: 98)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWYQQKPGQAPRP</u> <u>WIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQW</u> <u>NSNPWTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (это также полноразмерные легкие цепи Hu95-11yk, Hu95-21yk, Hu95-31yk, Hu95-41yk и Hu95-51yk)
Полноразмерные легкие цепи Hu95- 12wk, Hu95-22wk, Hu95-32wk, Hu95- 42wk и Hu95-52wk (SEQ ID NO: 99)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWYQQKPGQSPRP</u> <u>WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQW</u> <u>NSNPWTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (это также полноразмерные легкие цепи Hu95-12yk, Hu95-22yk, Hu95-32yk, Hu95-42yk и Hu95-52yk)
Полноразмерные легкие цепи Hu95- 13wk, Hu95-23wk, Hu95-33wk, Hu95- 43wk и Hu95-53wk (SEQ ID NO: 100)	<u>ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCRASSSVSYIHWYQQLPGTAPKP</u> <u>WIYATSNLASGVPDRFSGSKSGTSYSLAITGLQAEDEADYYCQQ</u> <u>WNSNPWTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (это также полноразмерные легкие цепи Hu95-13yk, Hu95-23yk, Hu95-33yk, Hu95-43yk и Hu95-53yk)
Полноразмерные легкие цепи Hu95- 14wk, Hu95-24wk, Hu95-34wk, Hu95- 44wk и Hu95-54wk (SEQ ID NO: 101)	<u>EIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCRASSSVSYIHWYQQLPGTSPKPW</u> <u>IYATSNLASGVPDRFSGSKSGTSYSLAITGLQAEDEADYYCQQWN</u> <u>SNPWTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN</u> NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (это также полноразмерные легкие цепи Hu95-14yk, Hu95-24yk, Hu95-34yk, Hu95-44yk и Hu95-54yk)

Последовательность антитела mAb1 против CTGF (из CN1829740B под названием памревлумаб, также известного как FG-3019) в качестве позитивного контроля является следующей:

5

Тяжелая цепь: (SEQ ID NO: 67)

EGQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWWSGI
GTGGGTYSTDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGDYYGSGSFFD
CWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 5 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь (SEQ ID NO: 68)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAHYQQKPEKAPKSLIYAASSL
 QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKLEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 10 TYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Примеры 1-3. Анализы активности связывания антител против CTGF

I. Анализы ELISA связывания антител против CTGF с человеческим белком CTGF

15 Способности к связыванию антител против человеческого CTGF измеряли посредством анализов ELISA антител и человеческого белка CTGF и Biacore. 96-луночный микропланшет прямо покрывали рекомбинантным белком CTGF. Интенсивность сигнала после добавления антитела использовали для измерения активности связывания антитела с CTGF. Конкретный экспериментальный способ
 20 является следующим:

Белок CTGF (R&D, кат. № 9190-CC) разводили до концентрации 0,2 мкг/мл буфером PBS (Shanghai BasalMedia, кат. № B320), имеющим pH 7,4, и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, кат. № CLS3590-100EA) в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет оставляли постоять в инкубаторе при 37°C в течение 2
 25 ч или при 4°C в течение ночи (16-18 ч). После отбрасывания жидкости добавляли блокирующий раствор разведенных в PBS 5% обезжиренного молока (обезжиренное молоко BD, кат. № 232100) в объеме 250 мкл/лунку, данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 3 ч или оставляли стоять при 4°C в течение ночи (16-18 ч) для блокирования. После блокирования
 30 блокирующий раствор отбрасывали, и планшет 5 раз промывали буфером PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween-20, pH 7,4). Затем добавляли анализируемые антитела (гибридомные очищенные антитела или гуманизированные антитела), которые были разведены разбавителем образца до разных концентраций, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в
 35 течение 1 ч. После инкубации планшет 3 раза промывали PBST, добавляли

меченное HRP (пероксидаза хрена) вторичное антитело козы против мышиногo антитела (Jackson Immuno Research, кат. № 115-035-003) или вторичное антитело козы против человеческого антитела (Jackson Immuno Research, кат. № 109-035-003), которые были разведены разбавителем образца, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После промывки планшета 3 раза PBST добавляли хромогенный субстрат TMB (тетраметилбензидин) (KPL, кат. № 52-00-03) в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 М H₂SO₄ в объеме 50 мкл/лунку. Показатели поглощения получали при длине волны 450 нм на микропланшет-ридере (Molecular Devices, VERSA max). Данные анализировали с использованием GraphPad Prism 5, и рассчитывали значения EC50 (полумаксимальная эффективная концентрация) связывания антител против CTGF с человеческим белком CTGF. Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 1 и в Таблице 13.

Таблица 13. Результаты анализов ELISA связывания антител против CTGF с человеческим белком CTGF

Анализируемый образец	EC50 анализа ELISA связывания с человеческим белком CTGF (нМ)	Анализируемый образец	EC50 анализа ELISA связывания с человеческим белком CTGF (нМ)
Hu147-11wk	0,045	Hu164-57wl	0,044
Hu147-12wk	0,046	Hu164-67wl	0,044
Hu147-13wk	0,043	Hu164-67yl	0,060
Hu147-14wk	0,073	Hu164-77wl	0,055
Hu147-15wk	0,034	Hu164-87wl	0,055
Hu147-21wk	0,067	Hu164-68wl	0,069
Hu147-22wk	0,056	Hu164-69wl	0,063
Hu147-23wk	0,058	mAb1	0,067
Hu147-24wk	0,048	Hu95-51yk	0,080
Hu147-31wk	0,056		
Hu147-32wk	0,063		
Hu147-33wk	0,054		
Hu147-34wk	0,134		

Данные экспериментальные результаты демонстрируют то, что все гуманизированные полноразмерные антитела против CTGF по настоящему раскрытию оказывают хорошее связывающее действие на человеческий белок CTGF.

II. Анализы ELISA связывания антител против CTGF с белком CTGF яванского макака

Способности к связыванию антител против CTGF обезьяны измеряли посредством анализов ELISA антител и белка CTGF обезьяны. 96-луночный микропланшет прямо покрывали белком против mFc. Затем давали связываться с планшетом белку CTGF яванского макака, меченному Fc. Затем добавляли антитело. Интенсивность сигнала после добавления использовали для измерения активности связывания антитела к CTGF яванского макака. Конкретный экспериментальный способ является следующим:

Белок против mFc (Sigma, кат. № M4280) разводили до концентрации 2 мкг/мл буфером PBS (Shanghai BasalMedia, кат. № B320), имеющим pH 7,4, и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, кат. № CLS3590-100EA) в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет оставляли постоять в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. После отбрасывания жидкости добавляли блокирующий раствор разведенных в PBS 5% обезжиренного молока (обезжиренное молоко BD, кат. № 232100) в объеме 250 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 3 ч или оставляли стоять при 4°C в течение ночи (16-18 ч) для блокирования. После блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и планшет 3 раза промывали буфером PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween-20, pH 7,4). Затем добавляли в каждую лунку 50 мкл 1 мкг/мл белка CTGF яванского макака-mFc. Данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 1 ч и затем 3 раза промывали буфером PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween-20, pH 7,4). Затем добавляли анализируемые антитела (гибридомные очищенные антитела или гуманизированные антитела), которые были разведены разбавителем образца до разных концентраций, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 1 ч. После инкубации планшет 3 раза промывали PBST, добавляли меченное HRP вторичное антитело козы против мышинного антитела (Jackson Immuno Research, кат. № 115-035-003) или вторичное антитело козы против человеческого антитела (Jackson Immuno Research, кат. № 109-035-003), которые были разведены разбавителем образца, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После промывки планшета 5 раз PBST добавляли хромогенный субстрат TMB (KPL, кат. № 52-00-03) в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 M H₂SO₄ в объеме 50 мкл/лунку. Показатели поглощения получали при длине волны 450 нм на микропланшет-ридере (Molecular Devices, VERSA max). Данные анализировали с использованием GraphPad Prism 5, и рассчитывали значения EC₅₀ связывания

антител против CTGF с CTGF яванского макака. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 14.

Таблица 14. Результаты анализов ELISA связывания антител против CTGF с белком CTGF яванского макака

Анализируемый образец	EC50 (нМ)	Анализируемый образец	EC50 (нМ)	Анализируемый образец	EC50 (нМ)
Hu147-11wk	0,052	Hu147-23wk	0,063	Hu164-57wl	0,029
Hu147-12wk	0,062	Hu147-24wk	0,080	Hu164-67wl	0,028
Hu147-13wk	0,043	Hu147-31wk	0,070	Hu164-77wl	0,038
Hu147-14wk	0,077	Hu147-32wk	0,079	Hu164-87wl	0,034
Hu147-15wk	0,053	Hu147-33wk	0,044	Hu164-68wl	0,036
Hu147-21wk	0,053	Hu147-34wk	0,144	Hu164-69wl	0,032
Hu147-22wk	0,073	Hu95-51yk	0,059	mAb1	0,086

- 5 Экспериментальные результаты показывают то, что все гуманизированные антитела против CTGF по настоящему раскрытию оказывают хорошее связывающее действие на белок CTGF обезьяны.

III. Анализы ELISA антител против CTGF и мышинового белка CTGF

- 10 Способности к связыванию антител против мышинового CTGF измеряли посредством анализов ELISA антител и мышинового белка CTGF. 96-луночный микропланшет прямо покрывали слитым белком мышинового CTGF. Интенсивность сигнала после добавления антитела использовали для измерения активности связывания антитела к мышинному CTGF. Конкретный экспериментальный способ
- 15 является следующим:

- Мышиный белок CTGF-his разводили до концентрации 0,5 мкг/мл буфером PBS (Shanghai BasalMedia, кат. № B320), имеющим pH 7,4, и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, кат. № CLS3590-100EA) в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет оставляли постоять в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. После
- 20 отбрасывания жидкости добавляли блокирующий раствор разведенных в PBS 5% обезжиренного молока (обезжиренное молоко BD, кат. № 232100) в объеме 250 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 3 ч или оставляли стоять при 4°C в течение ночи (16-18 ч) для блокирования. После блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и планшет 3 раза промывали
- 25 буфером PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween-20, pH 7,4). Затем добавляли анализируемые антитела (гибридомные очищенные антитела или гуманизированные антитела), которые были разведены разбавителем образца до разных концентраций, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 1 ч. После инкубации планшет 3 раза промывали

PBST, добавляли меченное HRP вторичное антитело козы против мышиногo антитела (Jackson Immuno Research, кат. № 115-035-003) или вторичное антитело козы против человеческого антитела (Jackson Immuno Research, кат. № 109-035-003), которые были разведены разбавителем образца, в объеме 50 мкл/лунку, и
 5 данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После промывки планшета 5 раз PBST добавляли хромогенный субстрат TMB (KPL, кат. № 52-00-03) в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 М H₂SO₄ в объеме 50 мкл/лунку. Показатели поглощения получали при длине волны 450 нм на
 10 микропланшет-ридере (Molecular Devices, VERSA max). Данные анализировали с использованием GraphPad Prism 5, и рассчитывали значения EC50 связывания антител против CTGF с мышиным CTGF. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 15.

Таблица 15. Результаты анализов ELISA связывания антител против CTGF с
 15 мышиным белком CTGF

Анализируемый образец	EC50 (нМ)	Анализируемый образец	EC50 (нМ)	Анализируемый образец	EC50 (нМ)
Hu147-11wk	0,228	Hu147-23wk	0,200	Hu164-57wl	0,041
Hu147-12wk	0,249	Hu147-24wk	0,263	Hu164-67wl	0,049
Hu147-13wk	0,127	Hu147-31wk	0,320	Hu164-77wl	0,058
Hu147-14wk	0,431	Hu147-32wk	0,349	Hu164-87wl	0,067
Hu147-15wk	0,159	Hu147-33wk	0,258	Hu164-68wl	0,065
Hu147-21wk	0,247	Hu147-34wk	0,664	Hu164-69wl	0,059
Hu147-22wk	0,336			mAb1	0,077

Данные экспериментальные результаты демонстрируют то, что все гуманизированные полноразмерные антитела против CTGF по настоящему раскрытию оказывают хорошее связывающее действие на мышиный белок CTGF.

20

Примеры 1-4. Эксперимент по блокированию функции антителами против CTGF

В данном эксперименте измеряли активность анализируемых гуманизированных антител против CTGF, блокирующих функцию TGF-β1, с
 25 использованием прибора Biacore.

Сначала фиксировали на биосенсорном чипе CM5 (кат. № BR-1005-30, GE) антиген – человеческий CTGF - посредством аминосвязывания на уровне 1500 RU. Затем давали протекать над поверхностью чипа в течение 150 с антителу против CTGF в высокой концентрации (150 мкг/мл), и инъецировали 50 нМ белок TGF-β1 в

течение 120 с. Сигналы реакции выявляли в реальном времени с использованием прибора Biacore T200 для получения кривой ассоциации и диссоциации. После завершения диссоциации в каждом цикле анализа биосенсорный чип тщательно промывали и регенерировали регенерационным буфером.

5 Полученные из данного эксперимента данные статистически анализировали с использованием программы GE Biacore T200 Evaluation версии 3.0.

Эффективность блокирования = $[1 - (\text{значение ответа образца} / \text{значение ответа пустого контроля})] \times 100\%$. Конкретные результаты показаны в Таблице 16.

10 Таблица 16. Результаты эксперимента по блокированию функции антителами против CTGF

Анализируемый образец	Процентное блокирование функции (%)	Анализируемый образец	Процентное блокирование функции (%)
Hu147-11wk	50,8%	Hu147-24wk	52,8%
Hu147-12wk	51,6%	Hu147-31wk	55,0%
Hu147-13wk	53,3%	Hu147-32wk	55,2%
Hu147-14wk	50,9%	Hu147-33wk	57,3%
Hu147-15wk	52,3%	Hu147-34wk	56,2%
Hu147-21wk	51,6%	Hu164-67wl	55,5%
Hu147-22wk	52,3%	Hu164-67yl	53,9%
Hu147-23wk	54,6%	mAb1	41,3%

Данные экспериментальные результаты демонстрируют то, что все гуманизированные антитела против CTGF по настоящему раскрытию имеют высокую активность блокирования функции.

15

Анализы Biacore аффинностей антител против CTGF

В данных анализах аффинности анализируемых гуманизированных антител против CTGF в отношении человеческого CTGF и мышинового CTGF измеряли с использованием прибора Biacore.

20 Давали биосенсорному чипу с белком А (кат. № 29127556, GE) осуществлять аффинный захват определенного количества анализируемого антитела, и затем давали человеческому или мышинному антигену CTGF определенной концентрации протекать по поверхности чипа. Сигналы реакции выявляли в реальном времени с использованием прибора Biacore для получения

25 кривой ассоциации и диссоциации. После завершения каждого цикла диссоциации биосенсорный чип тщательно промывали и регенерировали регенерационным раствором глицина-соляной кислоты, pH 1,5 (кат. № BR-1003-54, GE). Проточный

буфер для эксперимента представлял собой 1× буфер HBS-EP (кат. № BR-1001-88, GE).

- Полученные из данного эксперимента данные аппроксимировали с использованием программы GE Biacore T200 Evaluation версии 3.0 с использованием модели Лангмюра (1:1) с получением значений аффинности, которые подробно показаны в Таблицах 17 и 18.

Таблица 17. Аффинности реакции антител против CTGF в отношении человеческого белка CTGF

Антитело	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
Ch147	1,49E+07	6,93E-03	4,66E-10
Ch164	6,62E+07	8,83E-03	1,33E-10
Ch95	7,85E+06	3,02E-02	3,85E-09
Hu147-11wk	2,98E+07	3,36E-02	1,13E-09
Hu147-12wk	3,41E+07	3,30E-02	9,69E-10
Hu147-13wk	2,97E+07	2,40E-02	8,08E-10
Hu147-14wk	4,89E+07	5,54E-02	1,13E-09
Hu147-21wk	1,66E+07	1,62E-02	9,74E-10
Hu147-22wk	1,40E+07	1,42E-02	1,01E-09
Hu147-23wk	1,37E+07	1,12E-02	8,18E-10
Hu147-31wk	1,78E+07	1,59E-02	8,94E-10
Hu147-32wk	1,46E+07	1,33E-02	9,10E-10
Hu147-33wk	1,45E+07	1,04E-02	7,13E-10
Hu147-34wk	1,47E+07	1,55E-02	1,05E-09
Hu164-57wl	4,26E+07	2,94E-03	6,91E-11
Hu164-67wl	5,17E+07	1,96E-03	3,79E-11
Hu164-67yl	3,43E+07	2,27E-03	6,62E-11
Hu164-77wl	5,15E+07	1,76E-02	3,43E-10
Hu164-87wl	1,05E+08	2,04E-02	1,94E-10
Hu164-68wl	3,84E+07	1,16E-02	3,02E-10
Hu164-69wl	8,71E+07	2,80E-02	3,22E-10
Hu95-21wk	4,09E+06	3,03E-02	7,39E-09
Hu95-31wk	5,59E+06	3,26E-02	5,84E-09
Hu95-41wk	7,70E+06	4,08E-02	5,29E-09
Hu95-42wk	3,32E+06	1,91E-02	5,74E-09
Hu95-51yk	2,84E+07	1,02E-03	3,58E-11

- Таблица 18. Аффинности реакции антител против CTGF в отношении мышинового белка CTGF

Антитело	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
Ch147	3,12E+07	3,84E-02	1,23E-09
Ch164	1,23E+08	1,01E-02	8,22E-11
Ch95	1,38E+07	2,35E-02	1,71E-09
Hu147-11wk	1,20E+08	3,74E-01	3,11E-09
Hu147-12wk	3,75E+07	1,16E-01	3,09E-09
Hu147-13wk	5,73E+07	1,46E-01	2,55E-09
Hu147-23wk	8,18E+07	1,73E-01	2,12E-09
Hu147-31wk	3,83E+07	1,07E-02	2,79E-09
Hu147-32wk	1,37E+08	3,43E-01	2,49E-09
Hu147-33wk	9,01E+07	1,74E-01	1,93E-09
Hu164-57wl	7,35E+07	2,37E-03	3,22E-11
Hu164-67wl	6,36E+07	1,17E-03	1,84E-11
Hu164-67yl	5,34E+07	1,94E-03	3,63E-11
Hu164-77wl	5,98E+07	8,83E-03	1,48E-10
Hu164-87wl	5,24E+07	4,40E-03	8,40E-11
Hu164-68wl	5,70E+07	7,60E-03	1,33E-10
Hu164-69wl	6,17E+07	7,74E-03	1,26E-10
Hu95-21wk	5,29E+06	2,11E-02	3,99E-09
Hu95-31wk	7,84E+06	2,25E-02	2,87E-09
Hu95-41wk	1,39E+07	3,39E-02	2,44E-09
Hu95-42wk	5,66E+06	1,37E-02	2,42E-09
Hu95-51yk	2,56E+07	5,16E-04	2,02E-11

Данные экспериментальные результаты показывают то, что все химерные антитела Ch147 и Ch164, происходящие от мышиных антител mAb147 и aAb164, и гуманизированные антитела против CTGF, могут связываться с человеческим CTGF и мышинным CTGF с высокой аффинностью; все замены разными областями FR человеческого антитела зародышевой линии и обратные мутации не влияли на аффинность данных гуманизированных антител, и некоторые из модификаций даже могли усиливать аффинность антител в отношении антигенов.

Примеры 1-5. Ингибирование индуцированной TGF β миграции клеток C2C12 *in vitro* посредством антител против CTGF

Клетки C2C12 (мышинные миобласты, Банк клеток, Китайская академия наук, №GNM26) расщепляли 0,25%-ным панкреатином (Gibco, №25200-072), центрифугировали и затем ресуспендировали в бессывороточной среде DMEM

(среда Игла, модифицированная по Дульбекко) (Gibco, № 10564-029). Смеси клетка-антитело и смеси TGFβ1-антитело готовили с бессывороточной средой DMEM; плотность клеток составляла 2×10^5 /мл, концентрация рекомбинантного человеческого TGFβ1 (Cell signaling Technology, №8915LC) составляла 10 нг/мл, и концентрации всех анализируемых антител составляли 30 мкг/мл.

Удаляли верхнюю крышку и фильтровальную мембрану одноразовой системы хемотаксиса ChemoTx® (Neuro Probe, №106-8), и в нижнюю камеру добавляли смеси TGFβ1-антитело в объеме 30 мкл/лунку, для каждой группы в четырехкратной повторности. Фильтровальную мембрану ставили обратно, и на данную мембрану добавляли смеси клетка-антитело в объеме 50 мкл/лунку, для каждой группы в четырехкратной повторности. Верхнюю крышку ставили обратно, и систему помещали в инкубатор (37°C, 5% CO₂).

После 48 ч инкубации использовали чистое бумажное полотенце для впитывания жидкости на фильтровальной мембране. Данную фильтровальную мембрану удаляли, добавляли в каждую лунку в нижней камере 10 мкл предварительно охлажденного 0,25% панкреатина, и фильтровальную мембрану ставили обратно. После 5 мин расщепления данную систему центрифугировали при 1000 об./мин в течение 1 мин. Фильтровальную мембрану удаляли, и в каждую лунку в нижней камере добавляли 20 мкл раствора Cell Titer-Glo (Promega, №G7573). Данную систему инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Жидкость переносили в 384-луночный планшет с белым дном (Thermo Scientific, №267462), и производили считывание данного планшета посредством хемилюминисценции с использованием микропланшет-ридера (BMG, №PheraStar). Данные анализировали и обрабатывали с использованием Graphpad Prism 6.

Показатель ингибирования = [(среднее значение TGFβ - среднее значение группы образца) / (среднее значение группы TGFβ - среднее значение необработанной группы)] × 100%

Таблица 19. Результаты ингибирования миграции *in vitro* клеток C2C12 антителами против CTGF

Анализируемый образец	Процентное ингибирование миграции <i>in vitro</i> клеток C2C12 (%)
Hu147-11wk	72,2%
Hu147-33wk	63,8%
Hu164-57wl	75,4%
Hu164-67wl	78,8%
Hu164-67yl	76,5%
Hu164-77wl	72,8%
Hu164-87wl	76,4%

Hu164-68wl	76,3%
Hu164-69wl	74,2%
Hu95-51yk	80,0%
mAb1	63,0%

Данные результаты показывают то, что гуманизированные антитела против CTGF по настоящему раскрытию могут ингибировать способность клеток C2C12 к миграции *in vitro* после индукции TGFβ1 и демонстрировали большее ингибирование способности клеток C2C12 к миграции, чем антитело mAb1 позитивного контроля.

Пример 1-6. Ингибирование индуцированной TGFβ миграции клеток PANC1 *in vitro* антителами против CTGF

Клетки PANC-1 (человеческие клетки рака поджелудочной железы, ATCC (Американская коллекция типовых клеточных культур, №CRL-1469) расщепляли 0,25%-ным панкреатином (Gibco, №25200-072), центрифугировали и затем ресуспендировали в среде DMEM (Gibco, №10564-029), содержащей 0,1% фетальной телячей сыворотки (Gibco, №10099-141). Смеси клетка-антитело и смеси TGFβ1-антитело готовили со средой DMEM, содержащей 0,1% фетальной телячей сыворотки; плотность клеток составляла 4×10^5 /мл, концентрация рекомбинантного человеческого TGFβ (Cell signaling Technology, №8915LC) составляла 10 нг/мл, и концентрации всех анализируемых антител составляли 30 мкг/мл.

Удаляли верхнюю крышку и фильтровальную мембрану одноразовой системы хемотаксиса ChemoTx® (Neuro Probe, №106-8), и в нижнюю камеру добавляли смеси TGFβ-антитело в объеме 30 мкл/лунку, для каждой группы в четырехкратной повторности. Фильтровальную мембрану ставили обратно, и на данную мембрану добавляли смеси клетка-антитело в объеме 50 мкл/лунку, для каждой группы в четырехкратной повторности. Верхнюю крышку ставили обратно, и систему помещали в инкубатор (37°C, 5% CO₂).

После 48 ч инкубации использовали чистое бумажное полотенце для впитывания жидкости на фильтровальной мембране. Данную фильтровальную мембрану удаляли, добавляли в каждую лунку в нижней камере 10 мкл предварительно охлажденного 0,25%-ного панкреатина, и фильтровальную мембрану ставили обратно. После 5 мин расщепления данную систему центрифугировали при 1000 об./мин в течение 1 мин. Клетки, которые осели на дно

планшета, подсчитывали под инвертированным микроскопом (Leica, №DMIL LED). Данные анализировали и обрабатывали с использованием Graphpad Prism 6.

- Показатель ингибирования = $[(\text{среднее значение TGF}\beta - \text{среднее значение группы образца}) / (\text{среднее значение группы TGF}\beta - \text{среднее значение необработанной группы})] \times 100\%$

Таблица 20. Результаты ингибирования миграции клеток PANC1 *in vitro* антителами против CTGF

Анализируемый образец	Процентное ингибирование миграции клеток PANC1 <i>in vitro</i> (%)	Анализируемый образец	Процентное ингибирование миграции клеток PANC1 <i>in vitro</i> (%)
Hu147-11wk	73,9%	Hu164-77wl	74,3%
Hu147-33wk	77,0%	Hu164-87wl	82,1%
Hu164-57wl	81,2%	Hu164-68wl	76,9%
Hu164-67wl	75,7%	Hu164-69wl	76,9%
Hu164-67yl	78,0%	mAb1	71,7%
Hu95-51yk	80,0%		

- Данные результаты показывают то, что все гуманизированные антитела против CTGF по настоящему раскрытию могут ингибировать способность клеток PANC1 к миграции *in vitro* после индукции TGF β 1.

Пример 1-7. Ингибирование пролиферации PANC1 *in vitro* в мягком агаре антителами против CTGF

- В агар добавляли деионизированную воду (BD, №214220), и данную смесь нагревали с получением раствора 1,4%-ного геля. 2× среду DMEM (Thermo, №12100046) смешивали с данным раствором геля в соотношении 1:1 (об./об.), 500 мкл данной смеси добавляли в каждую лунку 24-луночного планшета (Costar, №3524) и оставляли при 4°C для застывания.
- Клетки PANC-1 (человеческие клетки рака поджелудочной железы, ATCC, №CRL-1469) расщепляли 0,25%-ным панкреатином (Gibco, №25200-072) и центрифугировали, и затем плотность данных клеток доводили до 5×10^4 клеток/мл средой DMEM (GE, №SH30243.01), содержащей 4% фетальной телячей сыворотки (Gibco, №10099-141). Готовили 2 мг/мл антител с использованием 2× среды DMEM.
- Клетки, антитела и раствор 1,4%-ного геля смешивали в соотношении 2:1:1 (об./об.), и 200 мкл данной смеси добавляли в каждую лунку 24-луночного планшета, в которую был добавлен разделяющий гель. После застывания верхнего геля в 24-луночный планшет добавляли 200 мкл среды DMEM,

содержащей 2% фетальной телячей выворотки. После 28 суток культивирования в инкубаторе (37°C, 5% CO₂) осуществляли фотографические записи с использованием высокопроизводительной системы анализа (Molecular Devices, ImageXpress), и анализировали площадь образовавшихся клонов клеток.

- 5 Показатель ингибирования = $(1 - \text{среднее значение группы образца} / \text{среднее значение необработанной группы}) \times 100\%$. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 21.

Таблица 21. Результаты ингибирования пролиферации клеток PANC1 *in vitro* в мягком агаре посредством антител против CTGF

Анализируемый образец	Процентное ингибирование пролиферации клеток PANC1 <i>in vitro</i> (%)
Hu147-11wk	23,76%
Hu147-33wk	22,30%
Hu164-67wl	24,2%
Hu164-67yl	21,7%
Hu95-51yk	20,24%

10

Данные результаты показывают то, что гуманизированные антитела из клонов mAb147 и mAb164 имеют значительное ингибирующее влияние на пролиферацию человеческих клеток рака поджелудочной железы (клетки PANC-1) *in vitro*.

15

Примеры 1-8. Биологическая активность антител против CTGE у животных

I. Ингибирование индуцированного блеомицином легочного фиброза мышей антителами против CTGF

20

Экспериментальный способ: 40 мышей случайным образом делили по массе тела на следующие 4 группы: нормальная контрольная группа (PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), в.б. (внутрибрюшинно), qod (один раз в двое суток)), группа mAb1 (10 мг/кг, в.б., qod), группа Hu164-67wl (10 мг/кг, в.б., qod) и группа Hu164-67yl (10 мг/кг, в.б., qod). Каждая группа включала 10 мышей.

25

Конкретное разделение на группы показано в Таблице 21 ниже. В 1-ые сутки эксперимента внутрибрюшинно инъецировали соответствующие растворители и антитела (10 мл/кг, нормальному контролю и модельным группам давали PBS) согласно массе тела. Через 2 ч осуществляли моделирование посредством распыления блеомицина (распыление осуществляли в концентрации 50 мг/8 мл в течение 30 мин и поддерживали в течение 5 мин). Затем растворители или антитела инъецировали внутрибрюшинно один раз в двое суток согласно

30

- разделению на группы. Экспериментальный период составлял 21 сутки, и внутрибрюшинное введение осуществлялось всего 11 раз. На 22-ые сутки эксперимента мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 1% пентобарбитала натрия (10 мл/кг) и затем фиксировали на операционном столе в
- 5 положении лежа горизонтально на спине. Делали 1 см разрез кожи вдоль срединной линии шеи, и нижний конец разреза достагал входа грудной клетки. Подкожные соединительные ткани и мышцы тупо отделяли щипцами для экспонирования трахеи. Соединительные ткани на обеих сторонах трахеи и между трахеей и пищеводом отделяли для выделения трахеи в свободном состоянии.
- 10 Вставляли постоянную венозную иглу и фиксировали лигированием хирургической нитью в месте, где канюля входила в трахею. Отбирали 1 мл шприцем 0,8 мл PBS, и данный шприц соединяли с входным концом постоянной венозной иглы. Медленно инъецировали в трахею PBS, оставляли на 30 с и затем медленно отбирали обратно. Во время отбора можно было наблюдать опалесцентную
- 15 пенистую жидкость. Промывку повторяли три раза, и жидкость промывки переносили в пробирку EP. Затем отбирали 0,5 мл PBS, и повторяли описанные выше стадии. Две данные жидкости промывки смешивали и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин, и супернатант хранили при -20°C до анализа. Супернатант BALF (жидкость бронхоальвеолярного лаважа) вновь
- 20 центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин, и затем супернатант отбирали и анализировали на растворимый коллаген (набор: Biocolor, № партии AA883).

Таблица 22. Разделение на группы и схема дозирования

Группа	Число животных	Лекарственное средство	Доза (мг/мл)	Путь введения	Частота введения
1	10	PBS	-	в.б.	Один раз в двое суток
2	10	mAb1	10	в.б.	Один раз в двое суток
3	10	Hu164-67wl	10	в.б.	Один раз в двое суток
4	10	Hu164-67yl	10	в.б.	Один раз в двое суток

- 25 Использовали статистическую программу Excel: средние значения рассчитывали как avg (среднее); значения SD (стандартное отклонение) рассчитывали как STDEV (стандартное отклонение); значения SEM (стандартная ошибка среднего) рассчитывали как STDEV/SQRT (квадратный корень) (числа животных на группу); для построения графиков использовали программу GraphPad
- 30 Prism, и данные статистически анализировали с использованием двухфакторного

ANOVA (дисперсионный анализ) или однофакторного ANOVA. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 23.

Таблица 23. Экспериментальные результаты ингибирования индуцированного блеомицином легочного фиброза мышей антителами против CTGF

Лекарственное средство	mAb1 (10 мг/кг)	Hu164-67w1 (10 мг/кг)	Hu164-67y1 (10 мг/кг)
Повышенный показатель ингибирования коллагена	53,2%	72,8% (p<0,05)	80,7% (p<0,05)

Данные результаты показывают то, что Hu164-67w1 или Hu164-67y1 демонстрировали сильное ингибирующее влияние на легочный фиброз у мышей.

II. Ингибирование подкожных ксенотрансплантатов опухолей – человеческих клеток рака поджелудочной железы Su86.86 - антителами против CTGF

Экспериментальный способ: 200 мкл клеток SU86.86 (ATCC, CRL-1837, $3,0 \times 10^6$ клеток) подкожно инокулировали в правый бок голых мышей Nu/Nu. Через одиннадцать суток после инокуляции, когда объем опухоли достигал примерно 140 мм³, исключали мышей, которые были слишком тяжелыми, или мышей с опухолями, которые были слишком большими или слишком маленькими. Мышей случайным образом делили по объему опухоли на 5 групп из 10, а введение начиналось в те же сутки. Антитела вводили внутривентриально дважды в неделю всего в течение 18 суток. Объем опухоли и массу тела измеряли 1-2 раза в неделю, и записывали данные. Разделение на группы и схема дозирования показаны в Таблице 24.

Таблица 24. Разделение на группы и схема дозирования

Группа	Число животных	Лекарственное средство	Доза (мг/кг)	Путь введения	Частота введения
1	10	Человеческий IgG	40	в.б.	Дважды в неделю
2	10	mAb1	40	в.б.	Дважды в неделю
3	10	Hu164-67y1	40	в.б.	Дважды в неделю
4	10	Hu164-67y1	20	в.б.	Дважды в неделю
5	10	Hu147-33wk	40	в.б.	Дважды в неделю

Данные записывали с использованием статистической программы Excel: средние значения рассчитывали как avg; значения SD рассчитывали как STDEV; значения SEM рассчитывали как STDEV/SQRT (числа животных на группу); для построения графиков использовали программу GraphPad Prism, и статистический анализ данных проводили с использованием двухфакторного ANOVA или однофакторного ANOVA.

Объем опухоли (V) рассчитывали следующим образом: $V = 1/2 \times L_{\text{long}} \times L_{\text{short}}^2$

Относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%) = $(T_t - T_0) / (C_t - C_0) \times 100$, где T_t и C_t представляют собой объемы опухолей группы обработки и контрольной группы в конце эксперимента; T_0 и C_0 представляют собой объемы опухолей в начале эксперимента.

Ингибирование роста опухоли TGI (%) = $1 - T/C$ (%).

Экспериментальные результаты:

На протяжении суток 1-18 эксперимента (D0 обозначает начало эксперимента, а D18 – сутки 18) введение осуществляли подкожной инъекцией дважды в неделю, и измеряли ингибиторные эффекты антител против CTGF на рост опухоли SU86.86. Экспериментальные результаты показаны в Таблице 24 и на ФИГ. 2. По сравнению с пустой контрольной группой изотипического человеческого IgG, 40 мг/кг mAb1, 40 мг/кг Hu164-67yl, 20 мг/кг Hu164-67yl и Hu147-33wk (40 мг/кг) демонстрировали 45%-ное, 53%-ное, 47%-ное и 54%-ное ингибирование роста опухоли соответственно. Группы 40 мг/кг mAb1, 40 мг/кг Hu164-67yl, 20 мг/кг Hu164-67yl и Hu147-33wk (40 мг/кг) могут значимо ингибировать рост опухоли Su86.86 (p меньше 0,001), и данные ингибиторные эффекты на опухоли Su86.86 являются в некоторой степени дозозависимыми. Кроме того, не было значимого изменения массы тела каждой группы мышей.

Таблица 25. Результаты ингибирования ксенотрансплантатных мышинных опухолей SU86.86 посредством антител против CTGF

Группа	Средний объем опухоли (мм ³)		Средний объем опухоли (мм ³)		% ингибирования роста опухоли	P (отн. пустого контроля)
	D0	SEM	D18	SEM	D18	
Человеческий IgG	144,35	12,30	1087,10	148,21	-	
mAb1 (40 мг/кг)	141,18	11,72	655,75	144,46	45	$p < 0,001$
Hu164-67yl (40 мг/кг)	138,75	8,71	582,95	76,14	53	$p < 0,001$

Hu164-67yl (20 мг/кг)	139,87	9,33	640,26	96,70	47	p<0,001
Hu147-33wk (40 мг/кг)	138,00	10,11	569,66	77,40	54	p<0,001

II. Препарат

Оборудование, антитела и способы, используемые в получении препаратов и выявлении, показаны ниже.

5 **ГФ – гель-фильтрация:**

Это - способ осуществления анализа разделения раствора посредством относительной связи между размером пор пор геля и размером молекулярного клубка образца полимера. ГФ% (процентная доля содержания мономера ГФ) = $A_{\text{мономера}} / A_{\text{общая}} \times 100\%$ ($A_{\text{мономера}}$ представляет площадь пика главного пика мономера в образце, и $A_{\text{общая}}$ представляет сумму площадей всех пиков).

Прибор для определения ГФ: Agilent 1260; колонка: Waters, XBrige BEH200Å SEC (300 × 7,8 мм 3,5 мкм).

Капиллярный гель-электрофорез НВ-КЭ:

15 Это - способ помещения геля в капилляр в качестве поддерживающей среды для электрофореза и разделения согласно молекулярной массе образца при определенном напряжении.

Процентная доля чистоты невосстанавливающего КЭ = $A_{\text{главного пика}} / A_{\text{общая}} \times 100\%$ ($A_{\text{главного пика}}$ представляет площадь главного пика легкой цепи + площадь главного пика тяжелой цепи, и $A_{\text{общая}}$ представляет сумму площадей всех пиков).

Прибор для определения КЭ: Beckman, модель: plus800.

вКИЭФ – электрофорез методом визуализируемой капиллярной изоэлектрофокусировки:

25 Это - методика разделения согласно различию изoeлектрических точек – pI – белков.

Процентная доля содержания нейтрального пика вКИЭФ = $A_{\text{нейтрального пика}} / A_{\text{общая}} \times 100\%$ ($A_{\text{общая}}$ представляет сумму площадей кислотного, нейтрального и основного пиков).

30 Изготовитель прибора для определения вКИЭФ: Simple protein, модель: muarice.

Измерение осмотического давления:

Для измерения осмотического давления использовали способ точки замерзания. Точку замерзания раствора измеряют с использованием высокочувствительного температурочувствительного элемента на основе пропорциональной связи между значением снижения точки замерзания и молярной
 5 концентрацией раствора, и затем превращают в осмотическое давление посредством количества электричества. Производитель прибора: Loser, модель: OM815.

Измерение концентрации белка:

10 Прибор для измерения концентрации белка: спектрофотометр, работающий в диапазоне ультрафиолетового-видимого излучения; модель: Nano Drop oneC; длина оптического пути: 1 мм. Рассчитываются следующие концентрации антител на основе концентраций белка.

15 Антитела против CTGF

Антителом против CTGF, использованным в следующих примерах, было Hu164-67yI, где антитело, использованное в образцах 1-6 Примера 2-1, Примера 2-2, Примера 2-3 и Примера 2-4, и образцах 1 и 2 Примеров 2-5, получали аффинной хроматографией после экспрессии белка; антитело, использованное в образцах 7 и
 20 8 Примеров 2-4, и образцах 3-9 Примеров 2-5, получали посредством дополнительного подвергания вышеупомянутого антитела ионообменной хроматографии и фильтрованию.

Пример 2-1. Скрининг буферной системы и значения pH препарата

25 Получали жидкие препараты, содержащие 200 мг/мл Hu164-67yI. Данные препараты дополнительно содержали 0,4 мг/мл полисорбата 80 (PS80), 70 мг/мл сахарозы и разные буферные системы. Данные буферные системы представляли собой 50 mM уксусную кислоту-ацетат натрия (AA), pH 5,0; 5,5; 50 mM гистидин-ацетат (His-AA), pH 5,5; 50 mM сукцинат натрия (SA), pH 5,5; 50 mM цитрат натрия
 30 (CA), pH 5,5; 50 mM гистидин-гидрохлоридный буфер (His-HCl), pH 5,5; 6,0; 6,5 и 50 mM натрия дигидрофосфат-динатрия гидрофосфат (PB), pH 6,5; 7,0. Каждый из препаратов фильтровали и разливали в бутылки, и данные бутылки закрывали пробкой и колпачком. Затем данные препараты оставляли стоять при постоянной температуре 40°C в течение 1 месяца и оценивали индексы, такие как полученные
 35 ГФ и невосстанавливающим КЭ.

- Результаты показаны в Таблице 26. Данные ГФ демонстрируют то, что в случае стояния при 40°C в течение 1 месяца уменьшения главных пиков образцов с использованием AA (pH 5,5), His-AA (pH 5,5), CA (pH 5,5) и His-HCl (pH 5,5) меньше, чем уменьшения в других образцах. Данные НВ-КЭ демонстрируют то, что в случае стояния при 40°C в течение 1 месяца, уменьшение главного пика образца при использовании His-HCl (pH 5,5) является наименьшим (5,1%).

Таблица 26. Результаты скрининга pH и буферной системы

Буферная система	Условия	ГФ%	ΔГФ%	НВ-КЭ%	ΔНВ-КЭ%
50 mM AA pH 5,0	D0	97,8		93,3	
	40°C M1	91,5	6,3	79,9	13,4
50 mM AA pH 5,5	D0	97,8		93,6	
	40°C M1	93,2	4,6	84,0	9,6
50 mM His-AA pH 5,5	D0	97,9		93,6	
	40°C M1	92,0	5,9	83,5	10,1
50 mM CA pH 5,5	D0	97,9		94,2	
	40°C M1	92,8	5,1	82,2	12,0
50 mM SA pH 5,5	D0	97,9		93,4	
	40°C M1	87,3	10,6	76,9	16,5
50 mM His-HCl pH 5,5	D0	97,9		93,4	
	40°C M1	92,9	5,0	88,3	5,1
50 mM His-HCl pH 6,0	D0	98,0		93,7	
	40°C M1	91,2	6,9	88,0	5,7
50 mM His-HCl pH 6,5	D0	98,0		93,4	
	40°C M1	89,8	8,2	86,3	7,1
50 mM PB pH 6,5	D0	97,9		93,8	
	40°C M1	88,0	9,9	86,3	7,5
50 mM PB pH 7,0	D0	97,8		93,9	
	40°C M1	84,9	12,9	82,5	11,4

- Примечание: в таблице «D» обозначает сутки; например, D7 обозначает 7 суток и так далее; D0 обозначает начало эксперимента; «M» обозначает месяц; например, M1 обозначает 1 месяц и так далее.

Пример 2-2. Анализ долговременной стабильности

- Готовили препарат, содержащий 200 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл PS80. Для исследования стабильности образцы оставляли при условиях 25°C и 4°C. Результаты показаны в Таблице 27.

Таблица 27. Анализ долговременной стабильности

Условия	ГФ%	НВ-КЭ%	вКИЭФ%
D0	97,9	93,4	57,1
4°C M3	96,7	93,7	57,6
4°C M5	97,4	93,4	57,5
25°C M3	94,0	92,0	51,4
25°C M5	94,3	90,3	46,0

Примечание: в данной таблице «М» обозначает месяц; например, М3 обозначает 3 месяца и так далее. То же самое применимо далее.

Данные результаты демонстрируют то, что: после оставления образцов постоять при 25°C в течение 5 месяцев чистота слегка снижалась, но данное
5 снижение находилось в приемлемом интервале; после оставления образцов постоять при 4°C в течение 5 месяцев все анализируемые индексы значительно не изменялись и, соответственно, данная формула имеет лучшую стабильность.

10 **Пример 2-3. Скрининг концентрации белка**

Жидкие препараты готовили согласно следующим формулам:

1) 200 мг/мл Nu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 6,0), 0,4 мг/мл PS80 и 70 мг/мл сахарозы

2) 150 мг/мл Nu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 6,0), 0,4 мг/мл PS80 и 70 мг/мл сахарозы.
15

Два данных препарата фильтровали и разливали в бутылки, и данные бутылки закрывали пробкой и колпачком. Образцы подвергали анализу стабильности при 40°C и анализу долговременной стабильности с ГФ, вКИЭФ и невосстанавливающим КЭ в качестве индексов для оценки.

20 **Таблица 28. Результаты скрининга концентрации белка**

Группа	Условия	ГФ%	ΔГФ%	НВ-КЭ%	ΔНВ-КЭ%	вКИЭФ %	ΔвКИЭФ %
1	D0	98,0		93,7		56,9	
	40°C M1	91,2	6,8	88,0	5,7	35,7	21,2
	25°C M1	96,7	1,3	94,1		52,1	4,8
	25°C M3	93,2	4,8	93,2	0,5	43,0	13,9
	25°C M5	92,3	5,7	90,2	3,5	32,8	24,1
	4°C M3	96,5	1,5	93,9		56,8	0,1
	4°C M5	97,0	1,0	93,0	0,7	56,9	0,0
2	D0	98,0		93,3		56,8	
	40°C M1	91,7	6,3	87,6	5,7	36,0	20,8
	25°C M1	97,0	1,0	93,2	0,1	53,5	3,3
	25°C M3	93,9	4,1	93,2	0,1	50,2	6,6

	25°C M5	94,1	3,9	89,6	3,7	45,2	11,6
	4°C M3	96,6	1,4	94,3		56,2	0,6
	4°C M5	97,3	0,7	93,1	0,2	56,3	0,5

Данные результаты показывают то, что, после того, как образцы 1) и 2) оставляли постоять при условиях 40°C M1, 25°C M3 и 4°C M5, не было значимого различия в чистоте. После стояния при условиях 25°C M5 уменьшения главных пиков ГФ и вКИЭФ образца 1) были слегка больше, чем уменьшения главных пиков ГФ и вКИЭФ образца 2).

Примеры 2-4. Скрининг поверхностно-активного вещества

Готовили препараты, содержащие 150 мг/мл Nu164-67yl, 50 мМ His-HCl, pH 5,5, 70 мг/мл сахарозы и разные поверхностно-активные вещества. Каждый из препаратов фильтровали и разливали в бутылки, и данные бутылки закрывали пробкой и колпачком. Образцы отбирали и подвергали встряхиванию (25°C, 300 об./мин), 5 циклам замораживания-оттаивания (FT5C, условия: -35°C от -2 до 8°C), высокотемпературному стоянию при 40°C и анализу долговременной стабильности (4°C, M3), и проверяли показатели ГФ, невосстанавливающего КЭ и вКИЭФ. Конкретные составы формулы показаны в Таблице 29.

Таблица 29. Результаты скрининга типа и концентрации поверхностно-активного вещества

Группа	Буферная система	Условия	ГФ%	НВ-КЭ%	вКИЭФ%
1	0,2 мг/мл PS20	D0	97,8	93,3	56,9
		Встряхивание	97,4	95,1	57,1
		FT5C	96,8	92,2	56,8
		4°C M3	97,6	93,1	58,7
2	0,4 мг/мл PS20	D0	97,8	93,4	56,6
		Встряхивание	97,4	95,0	57,0
		FT5C	96,7	92,5	56,7
		4°C M3	97,5	93,4	58,7
3	0,6 мг/мл PS20	D0	97,8	93,9	57,0
		Встряхивание	97,3	94,8	57,5
		FT5C	96,6	92,1	54,0
		4°C M3	97,2	93,5	58,1
4	0,2 мг/мл PS80	D0	97,7	93,3	56,9
		Встряхивание	97,3	95,1	57,1
		FT5C	96,6	92,1	56,6

		4°C M3	97,5	93,7	58,0
5	0,4 мг/мл PS80	D0	97,7	93,8	57,2
		Встряхивание	96,8	95,0	57,1
		FT5C	96,6	92,0	56,7
		4°C M3	97,5	93,7	57,7
6	0,6 мг/мл PS80	D0	97,7	93,3	57,0
		Встряхивание	97,2	94,9	57,1
		FT5C	96,5	92,0	56,2
		4°C M3	97,5	93,4	57,7
7	0,4 мг/мл полоксамера 188	D0	98,4	95,2	61,9
		40°C M1	94,9	91,1	41,5
8	0,4 мг/мл PS80	D0	98,4	94,7	61,8
		40°C M1	94,2	90,8	40,2

Данные экспериментальные результаты показывают то, что нет значимого различия в результатах по чистоте образцов, содержащих разные типы и концентрации полисорбата. После стояния при 40°C в течение 1 месяца не было

5 значимого различия в чистоте двух образцов, содержащих ту же самую концентрацию PS80 и полоксамера 188.

Примеры 2-5. Оптимизация формулы препарата

Жидкие препараты готовили согласно следующим формулам:

- 10 1) 200 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 6,0), 70 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл PS80
- 2) 200 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 6,0), 70 мг/мл трегалозы и 0,4 мг/мл PS80
- 15 3) 150 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы и 0,4 мг/мл PS80
- 4) 150 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 2% PEG 3350
- 5) 150 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 50 mM аргинин
- 20 6) 150 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 1% маннита
- 7) 150 мг/мл Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 0,5 mM EDTA

8) 150 мг/мл Nu164-67yl, 50 мМ His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 5 мМ EDTA

9) 150 мг/мл Nu164-67yl, 50 мМ His-HCl (pH 5,5), 70 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 10 мМ EDTA.

- 5 Каждый из препаратов фильтровали и разливали в бутылки, и данные бутылки закрывали пробкой и колпачком. Образцы подвергали анализу стабильности при 40°C с ГФ, вКИЭФ и невосстанавливающим КЭ в качестве индексов для оценки.

Таблица 30. Оптимизация формулы

Группа	Условия	ГФ%	ΔГФ%	НВ-КЭ%	ΔНВ-КЭ%	вКИЭФ%	ΔвКИЭФ%
1	D0	98,0		93,7		56,9	
	40°C M1	91,2	6,1	88,0	5,7	35,7	21,2
2	D0	98,0		93,5		56,8	
	40°C M1	90,8	7,2	88,9	4,6	34,0	22,8
3	D0	98,4		94,7		61,8	
	40°C M1	94,2	4,2	90,8	3,9	40,2	21,6
4	D0	98,3		94,4		61,5	
	40°C M1	94,3	4,0	90,5	3,9	40,6	20,9
5	D0	98,4		94,5		61,7	
	40°C M1	94,2	4,2	91,0	3,5	40,6	21,1
6	D0	98,0		95,1		60,7	
	40°C M1	94,1	3,9	91,1	4,0	40,1	20,6
7	D0	98,3		94,8		61,7	
	40°C M1	94,7	3,6	91,8	3,0	41,0	20,7
8	D0	98,3		94,6		61,6	
	40°C M1	94,7	3,6	91,6	3,0	40,9	20,7
9	D0	98,3		94,5		62,2	
	40°C M1	94,7	3,6	92,2	2,3	40,7	21,5

10

- Данные результаты показывают, что: после того, как образцы оставляли постоять при 40°C в течение 1 месяца, не было значимого различия в чистоте между образцами, в которые была добавлена только сахароза, и образцами, в которые были добавлены другие стабилизаторы. Стабильность формулы была хорошей при данных условиях. Данные результаты свидетельствуют о том, что добавление стабилизаторов, отличных от сахарозы, не будет влиять на
- 15

стабильность формулы, и формулы, которые не содержат другие стабилизаторы, достигли стабильности формул, которые содержат другие стабилизаторы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против фактора роста соединительной ткани (CTGF) и буфер, где указанное антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 8, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 9;

ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 7;

ii-i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 69, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 70;

или

ii-ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области тяжелой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 85, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности, идентичные последовательностям переменной области легкой цепи, изложенным в SEQ ID NO: 70;

при этом указанный буфер представляет собой буфер на основе соли гистидина, предпочтительно гистидин-гидрохлоридный буфер или гистидин-ацетатный буфер, и более предпочтительно - гистидин-гидрохлоридный буфер.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой антитело против CTGF содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, соответственно;

предпочтительно переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 34, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 30;

более предпочтительно антитело против CTGF содержит тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 64.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где указанная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,5, предпочтительно от примерно 5,0 до примерно 6,0 и более предпочтительно примерно 5,5.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, в которой антитело против CTGF находится в концентрации от примерно 100 мг/мл до примерно 200 мг/мл, предпочтительно от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, и более предпочтительно - примерно 150 мг/мл.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, причем указанное поверхностно-активное вещество представляет собой предпочтительно полисорбат или полоксамер, более предпочтительно полисорбат 80, полисорбат 20 или полоксамер 188, и наиболее предпочтительно - полисорбат 80.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, в которой поверхностно-активное вещество находится в концентрации от примерно 0,05 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл, предпочтительно от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл, и более предпочтительно - примерно 0,4 мг/мл.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-6, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит сахар, при этом указанный сахар предпочтительно выбран из одного или более чем одного из сахарозы, маннита и трегалозы, и более предпочтительно – представляет собой сахарозу.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой сахар находится в концентрации от примерно 20 мг/мл до примерно 100 мг/мл, предпочтительно от примерно 40 мг/мл до примерно 80 мг/мл и более предпочтительно - примерно 70 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, в которой буфер находится в концентрации от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ, предпочтительно от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ и более предпочтительно - примерно 50 мМ.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, где указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит стабилизатор, и при этом указанный стабилизатор выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG), аргинина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA).

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, содержащая следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, (b) от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл полисорбата, (c) от примерно 40 мг/мл до примерно 80 мг/мл сахара и (d) от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ буфера на основе соли гистидина; причем указанная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,0;

предпочтительно содержащая следующие компоненты:

(a) антитело против CTGF в концентрации примерно 150 мг/мл, (b) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 70 мг/мл сахарозы и (d) примерно 50 мМ гистидин-гидрохлоридного буфера; причем указанная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,5 до примерно 5,7; указанное антитело против CTGF содержит тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 64.

12. Лиофилизированный препарат, где указанный лиофилизированный препарат может, при восстановлении, образовывать фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-11.

13. Способ получения лиофилизированного препарата, включающий стадию лиофилизации фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11.

14. Лиофилизированный препарат, где указанный препарат получен лиофилизацией фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11.

15. Восстановленный раствор, где указанный восстановленный раствор получен восстановлением лиофилизированного препарата по п. 12 или 14;

предпочтительно указанный восстановленный раствор содержит:

(a) антитело против CTGF в концентрации от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл, (b) от примерно 0,2 мг/мл до примерно 0,6 мг/мл полисорбата, (c) от примерно 40 мг/мл до примерно 80 мг/мл сахара и (d) от примерно 30 мМ до примерно 70 мМ буфера на основе соли гистидина; причем указанная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,0 до примерно 6,0;

более предпочтительно указанный восстановленный раствор содержит:

(a) антитело против CTGF в концентрации примерно 150 мг/мл, (b) примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80, (c) примерно 70 мг/мл сахарозы и (d) примерно 50 мМ гистидин-гидрохлоридного буфера; причем указанная фармацевтическая композиция имеет pH от примерно 5,5 до примерно 5,7; указанное антитело против CTGF содержит тяжелую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 61, и легкую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 64.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11 или восстановленный раствор по п. 15, представляющие собой препарат для внутривенной, подкожной, внутривенной или внутримышечной инъекции, предпочтительно препарат для внутривенной инъекции.

17. Изделие, содержащее контейнер, где указанный контейнер содержит фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-11, лиофилизированный препарат по п. 12 или 14, или восстановленный раствор по п. 15.

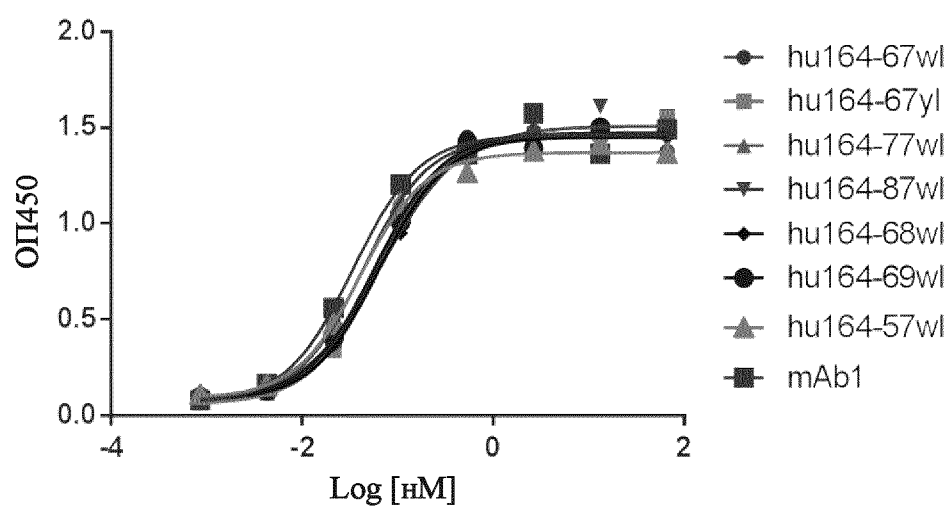
18. Способ лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с CTGF, где указанный способ включает введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11, лиофилизированного препарата по п. 12 или 14, восстановленного раствора по п. 15 или изделия по п. 17;

где заболевание, ассоциированное с CTGF, предпочтительно представляет собой фиброзное заболевание, гипертензию, диабет, инфаркт миокарда, артрит, ассоциированное с CTGF заболевание, связанное с пролиферацией клеток, атеросклероз, глаукому или рак;

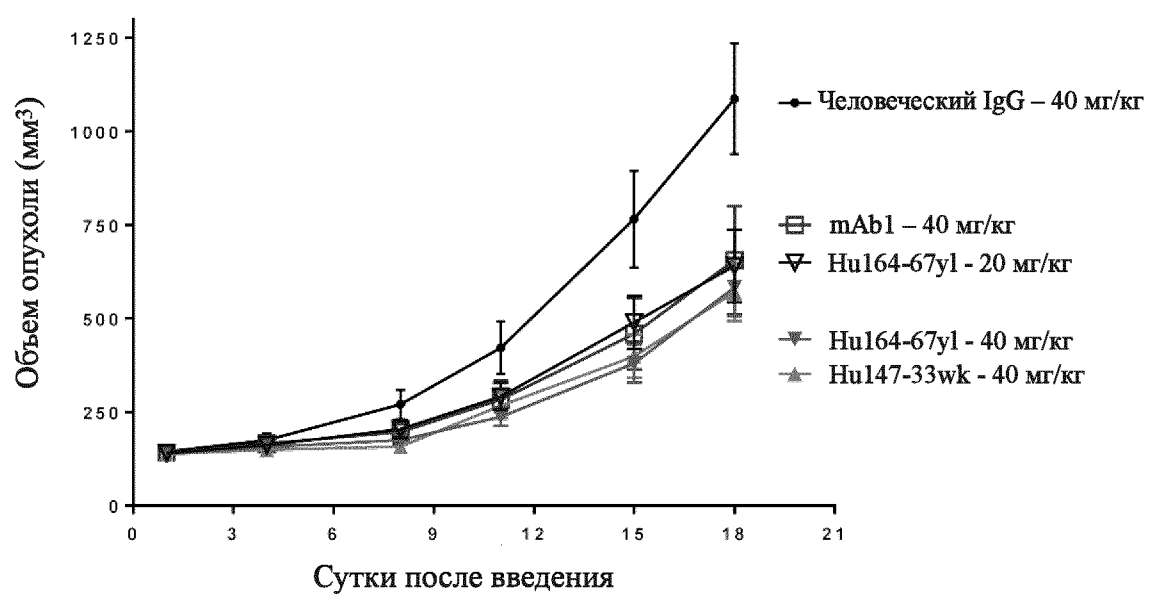
предпочтительно указанное фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: идиопатический легочный фиброз, диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, остеоартрит, склеродермия, хроническая сердечная недостаточность, цирроз печени и фиброз почки;

предпочтительно указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: острый лимфобластный лейкоз, дерматофиброма, рак молочной железы, ангиолипома, ангиолейомиома, десмопластический рак, рак предстательной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, желудочно-кишечный рак и рак печени.

1



ФИГ. 1



ФИГ. 2