

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 851**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/JP2012/083206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13094723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12860742 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2796550**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-CTGF humano**

30 Prioridad:

22.12.2011 JP 2011281811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.04.2018

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411 , JP**

72 Inventor/es:

**IWASAKI, SHOJI;
MORIYA, RYUICHI;
YOSHINO, MASAYASU y
TAKAKURA, KOJI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 665 851 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo anticuerpo anti-CTGF humano

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo anti-CTGF humano. Específicamente, el nuevo anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención es un anticuerpo anti-CTGF humano que tiene una actividad de unión y/o actividad neutralizante excelentes, en comparación con los anticuerpos anti-CTGF humano convencionales.

10

Técnica antecedente

El CTGF (factor de crecimiento de tejido conjuntivo) es una proteína secretada rica en restos de cisteína con un peso molecular de aproximadamente 36 a 38 kDa, que pertenece a una familia CCN (Documento no Patente 1), y que se ha sabido convencionalmente que está inducido por el TGF- β que puede considerarse como el factor de crecimiento más importante en la fibrosis (Documento no Patente 2). Por lo tanto, se sugiere que el TGF- β induce el CTGF y el CTGF inducido promueve la fibrosis de órganos o tejidos, y se cree que el CTGF tiene un importante papel en la fibrosis, la proliferación celular, metabolismo de la matriz extracelular, angiogénesis, arteriosclerosis, y similares (Documento no Patente 3).

15

20

Se ha llegado a saber que hay muchos dominios presentes en el CTGF, que interactúan con otros factores. Entre ellos se sabe que el CTGF se acopla directamente con el TGF- β o BMP4 mediante el dominio C de Willebrand, y produce la promoción de la señalización de TGF- β o la inhibición de la señalización de BMP (Documento no Patente 4).

25

Se ha llegado a saber que la expresión de CTGF aumenta en distintas enfermedades renales (por ejemplo, enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, nefropatía con IgA, glomeruloesclerosis segmentaria, nefritis relacionada con ANC, glomerulonefritis progresiva aguda, nefropatía crónica por trasplante, síndrome nefrótico, nefritis del lupus, y glomerulonefritis membranosa proliferativa (Documento no Patente 5), y se ha informado que el CTGF está implicado profundamente en la fibrosis (Documento no Patente 6).

30

Además, se ha informado de que el CTGF está implicado en distintos tipos de fibrosis (escleroderma, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedades con fibrosis intestinal tal como fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis producida por hepatitis B o C crónica, fibrosis inducida por radiación, fibrosis producida por cicatrización de heridas, e hipertrofia y fibrosis cardíaca), enfermedades vasculares proliferativas, retinopatía diabética, cáncer, y similares, y por lo tanto se puede pensar que el CTGF podría ser una nueva diana terapéutica (Documentos no patente 7 y 8).

35

Por lo tanto, se puede desarrollar un anticuerpo monoclonal que se una específicamente al CTGF y que tiene actividad de inhibición de distintas acciones del CTGF, el anticuerpo monoclonal se espera que sea útil para el diagnóstico, prevención o tratamiento de distintas enfermedades en las que está envuelto el CTGF en su patogénesis.

40

Como anticuerpos que presentan una función inhibidora contra el CTGF humano, que se habían estudiado hasta ahora, se han comunicado los anticuerpos monoclonales humanos M84 y M320 (Documento de Patente 1), CLN1 (Documento de patente 2), un anticuerpo monoclonal de ratón CTGF-m2-1 (Documento de Patente 3), y similares. Entre ellos, el CLN1 se ha investigado con más detalle, y su efecto se ha identificado en un modelo de fibrosis pulmonar intersticial o un modelo de fibrosis intersticial por ligadura ureteral unilateral. El CLN1 se estudió en un ensayo clínico (de Fase II) como FG-3019.

45

Sin embargo, no se puede decir que los anticuerpos convencionales tengan una actividad de unión con el CTGF, ni tenga una actividad neutralizante suficientemente fuerte para el CTGF desde el punto de vista de eficacia terapéutica.

50

En general, los ejemplos de los factores principales que definen la dosis eficaz de los anticuerpos farmacéuticos incluyen la actividad de unión o actividad neutralizante que tiene el anticuerpo para un antígeno, y la cantidad de un antígeno presente en el cuerpo. Sin embargo, se puede decir que la mejora de la actividad de unión o actividad neutralizante da lugar directamente a la reducción de la dosis, y como resultado, es una mejora muy útil, que da lugar a la reducción de la carga económica de un paciente o costes médicos.

55

Por estas razones, es esencial adquirir un anticuerpo anti-CTGF humano que tiene una actividad de unión o actividad neutralizante más fuerte que los anticuerpos convencionales con el fin de utilizarlos en la prevención o tratamiento de distintas enfermedades, en las que el CTGF está implicado en la patogénesis.

60

Técnica relacionada

Documentos de Patente

- 5 [Documento de Patente 1] JP-A-2000-232884 (que se corresponde con el documento EP1043335A1)
 [Documento de Patente 2] WO 2004/108764 (que se corresponde con el documento US20040248206A1)
 [Documento de Patente 3] WO 2007/066823

Documentos no Patentes

- 10 [Documento no Patente 1] D.M. Bradham et al., J. Cell Biol. 114:1285-1294 (1991)
 [Documento no Patente 2] A. Igarashi et al., Mol. Biol. Cell 4:637-645 (1993)
 [Documento no Patente 3] Blom IE et al., Matrix Biol. 21(6):473-82 (2002)
 [Documento no Patente 4] Abreu, et al., Nat. Cell. Biol. 4, 599-604 (2002)
 15 [Documento no Patente 5] Ito Y et al., Kidney Int. 53(4) 853-61 (1998)
 [Documento no Patente 6] Phanish MK et al., Nephron Exp Nephrol. 114(3) e83-92(2010)
 [Documento no Patente 7] Shi-Wen X et al., Cytokine Growth Factor Rev. 19(2):133-44 (2008)
 [Documento no Patente 8] Jun JI et al., Nat Rev Drug Discov. 10(12):945-63 (2011)

20 **Divulgación de la invención**

Problema que resolver mediante la invención

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos anti-CTGF humano que tienen una actividad de unión y/o actividad neutralizante excelentes, en comparación con los anticuerpos anti-CTGF humano convencionales.

Medios para resolver los problemas

30 La presente invención incluye las siguientes invenciones como sustancias y métodos médica o industrialmente útiles.

[1] Un anticuerpo anti-CTGF humano o un fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano, que comprende:

35 una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10; y
 una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

40 [2] El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con [1], en el que una región constante de cadena pesada del anticuerpo es una región constante de Igy1 humana.[3] El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con [1], en el que una región constante de cadena ligera del anticuerpo es una región constante de Igk humana.

45 [4] El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con [1]. en el que una región constante de cadena pesada del anticuerpo es una región constante de Igy1 humana, y una región constante de cadena ligera del anticuerpo es una región constante de Igk humana.

[5] El fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con [1], en el que el fragmento es un fragmento de cadena sencilla de la región variable, Fab, Fab', o F(ab')₂.

50 [6] El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4] o el fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con [1] o [5], en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está fusionado con otro péptido o proteína, o está modificado con un agente de modificación.

[7] El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con [1], que comprende:

una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12; y
 una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 8.

55 [8] Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con [1] y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con [1].

60 [9] Una célula huésped que se selecciona de entre el grupo que consiste en las siguientes (a) y (b):

- (a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con [1] y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con [1]; y
 65 (b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que

comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con [1] y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con [1].

5

[10] Una célula huésped que se selecciona de entre el grupo que consiste en las siguientes (a) y (b):

(a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con [7] y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con [7]; y

10

(b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con [7] y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con [7].

15

[11] Un método para la producción de un anticuerpo anti-CTGF humano o fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano comprendiendo el método la expresión de un anticuerpo anti-CTGF humano o fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano cultivando la célula huésped de acuerdo con [9].

20

[12] Un método para la producción de un anticuerpo anti-CTGF humano, comprendiendo el método la expresión de un anticuerpo anti-CTGF humano cultivando la célula huésped de acuerdo con [10].

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-CTGF humano que tienen una actividad de unión y/o actividad neutralizante excelentes, en comparación con los anticuerpos anti-CTGF humano convencionales. El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención tiene una potente acción antifibrótica inhibiendo la función del CTGF humano, y es útil para la prevención o tratamiento de distintas enfermedades, en las que está implicado el CTGF humano en su patogénesis. Además, el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención proporciona mejoras significativas en las aplicaciones clínicas tales como la reducción de la dosificación, extensión del intervalo de administración, mejora del modo de administración (por ejemplo, una inyección subcutánea), y similares, y, por lo tanto, contribuye enormemente a la mejora de la eficacia del tratamiento y la aceptación del paciente.

30

Realizaciones para llevar a cabo la invención

35

De aquí en adelante se describirá la presente invención con detalle.

Los presentes inventores hicieron extensos estudios sobre la preparación de anticuerpos anti-CTGF humano, y como resultado, tuvieron éxito en la producción de anticuerpos anti-CTGF humano que tienen una actividad de unión mejorada y una actividad neutralizante excelente en comparación con anticuerpos anti-CTGF humano convencionales.

40

La estructura básica de una molécula de anticuerpo se comparte por todas las clases de anticuerpo, y está configurada con una cadena pesada que tiene un peso molecular de 50000 a 70000 y una cadena ligera que tiene un peso molecular de 20000 a 30000. La cadena pesada consiste habitualmente en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 440 aminoácidos. Las cadenas pesadas tienen estructuras características de diferentes clases que se llaman las cadenas γ , μ , α , δ y ϵ que corresponden a la IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Además, la IgG existe como IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, y las cadenas correspondientes se llaman $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$, respectivamente. Una cadena ligera consiste habitualmente en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 220 aminoácidos, de los que se conocen dos tipos, tipo L y tipo K, y que se llaman las cadenas λ y κ , respectivamente. Con respecto a la configuración peptídica de la estructura básica de una molécula de anticuerpo, dos cadenas pesadas homologas y dos cadenas ligeras homologas se unen mediante enlaces disulfuro (enlaces S-S) y enlaces no covalentes, y el peso molecular es de 15000 a 190000. Los dos tipos de cadenas ligeras son capaces de emparejarse con cada cadena pesada. Cada molécula de anticuerpo siempre consiste en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

45

50

55

Hay cuatro enlaces S-S intracatenarios en una cadena pesada (cinco enlaces para las cadenas μ y ϵ) y dos en una cadena ligera; se forma un bucle por 2100 a 100 restos de aminoácidos, y esta estructura estérica es similar entre los bucles, y se llama una unidad estructural o dominio. Para ambas cadenas pesadas y cadenas ligeras, la secuencia de aminoácidos del dominio localizado en el extremo N por lo tanto no es constante, incluso en una referencia convencional de la misma clase (subclase) de la misma especie animal, y este dominio se llama región variable. Cada uno de los dominios se denomina región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), respectivamente. La secuencia de aminoácidos del lado del extremo C por eso es casi constante en cada clase o subclase, y se llama región constante (cada uno de los dominios se llaman CH1, CH2, CH3 y CL, respectivamente).

60

65

El sitio del determinante antigénico del anticuerpo se configura con VH y VL, y la especificidad de unión depende de la secuencia de aminoácidos de este sitio. Por otra parte, las actividades biológicas tales como la unión a los complementos o las distintas células reflejan la diferencia en la estructura de la región constante entre las distintas clases de Ig. La variabilidad en las regiones variables de la cadena ligera y cadenas pesadas se limita principalmente a tres regiones hipervariables que existen en ambas cadenas, y estas regiones se llama regiones determinantes de complementariedad (CDR; CDR1, CDR2, y CDR3 comenzando desde el lado del extremo N). La parte restante de la región variable se llama región marco conservada (FR) y es relativamente constante.

10 El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención que han preparado los presentes inventores satisfactoriamente es un anticuerpo anti-CTGF humano que tiene las siguientes características.

15 Un anticuerpo anti-CTGF humano que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

Específicamente, los presentes inventores construyeron anticuerpos que utilizan una tecnología de anticuerpos monoclonales humanos, "VelocImmune" de ratón [tecnología de anticuerpos VelocImmune; Regeneron Inc. (Patente de EE. UU. N.º 6596541)], y se exploran los anticuerpos utilizando ensayos de distintas actividades biológicas y propiedades físicas, de esta manera identificando satisfactoriamente el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención. En la tecnología VelocImmune, los ratones transgénicos en los que se reemplazan la cadena pesada de inmunoglobulina endógena y las regiones variables de cadena ligera con las regiones variables humanas correspondientes, se inmunizan con el antígeno de interés (por ejemplo, el CTGF humano), y se recuperan las células linfáticas de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas se fusionan con las células de mieloma de ratón para preparar hibridomas. Las células de hibridoma se exploran para identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés. Los anticuerpos que se producen en el presente documento son anticuerpos que tienen regiones variables de anticuerpos humanos y las regiones constantes de anticuerpos de ratón (a los que también se hace referencia como anticuerpos quiméricos). Entonces, si se identifica el anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés, se aíslan los ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo de las células de hibridoma y se unen con los ADN que codifican las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de una clase deseada del anticuerpo humano, respectivamente. El gen resultante que codifica la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo se expresa en células (por ejemplo, células CHO) para producir una molécula de anticuerpo. La cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo producidas por el método anterior son la cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo "humano completo" derivado de un gen de inmunoglobulina humana.

El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención se puede preparar fácilmente, basándose en la información de la secuencia de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera como se desvela en la presente memoria descriptiva, utilizando métodos conocidos en la técnica, por un experto en la técnica. Preferentemente, el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención se puede preparar como un anticuerpo humano completo uniendo la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera a una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera de un anticuerpo humano, respectivamente. Específicamente, se prepara un fragmento genético de la región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 10) del anticuerpo de la presente invención y un fragmento genético de la región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de bases que codifica los aminoácidos de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo de la presente invención. Además, estos genes de la región variable están unidos a una clase adecuada de genes de la región constante de un anticuerpo humano para preparar un gen de anticuerpo completamente humano. Posteriormente, este gen de anticuerpo se une a un vector de expresión adecuado y se introduce en las células cultivadas. Finalmente, las células cultivadas se cultivan y se puede obtener un anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante del cultivo.

Los fragmentos genéticos que codifican los aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención se pueden sintetizar utilizando un método de síntesis genética conocido en la técnica, basándose en, por ejemplo, secuencias de bases diseñadas basándose en las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera. Como tales métodos de síntesis, se pueden utilizar distintos métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como el método de síntesis genética de anticuerpos descrito en el documento WO 90/07861.

Después, los fragmentos genéticos variables descritos anteriormente se unen a los genes de las regiones constantes del anticuerpo humano para preparar un gen de anticuerpo completamente humano. Aunque se pueden escoger cualquiera de las subclases de la región constante (por ejemplo, la región constante de una cadena pesada tal como las cadenas γ 1, γ 2, γ 3 o γ 4, y la región constante de una cadena ligera tal como las cadenas λ o κ) como la región constante del anticuerpo humano que se utiliza, se puede utilizar preferentemente la Igy1 humana como la región constante de cadena pesada, y la Igk humana como la región constante de cadena ligera. Posteriormente a la preparación de este gen de anticuerpo completamente humano, se puede llevar a cabo la

introducción del gen de anticuerpo en un vector de expresión, la introducción del vector de expresión en células cultivadas, el cultivo de las células cultivadas, la purificación del anticuerpo y similares utilizando distintos métodos conocidos en la técnica.

5 Un vector de expresión que se une al gen de anticuerpo obtenido de esta manera incluye un vector pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza Biologics), pero no está limitado específicamente, a condición de que pueda expresar dicho gen de anticuerpo. También, se puede utilizar un vector de expresión que ya tiene un gen de región constante de Ig humana tal como AG-y1 o AG-K (por ejemplo, véase el documento WO 94/20632).

10 El vector de expresión escrito anteriormente se introduce en células cultivadas, por ejemplo, mediante un método de fosfato cálcico o un método de electroporación y similares.

Como las células cultivadas en las que se introduce el vector de expresión, se pueden utilizar células cultivadas tales como células CHO-K1SV, CHO-DG44 y células 293, y estas células se pueden cultivar por un método convencional.

15 Después del cultivo descrito anteriormente, el anticuerpo acumulado en el sobrenadante del cultivo se puede purificar mediante distintas columnas de cromatografía, por ejemplo, distintos procesos cromatográficos utilizando una columna de Proteína A o Proteína G.

20 El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención es un anticuerpo que se une al CTGF humano. Ejemplos de un método para medir la actividad de unión del anticuerpo anti-CTGF humano que se obtiene para el CTGF humano incluye un método de ELISA y un método de análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Por ejemplo, cuando se utiliza un ELISA, el CTGF humano (SEQ ID NO: 14) se inmoviliza en una placa de ELISA, y se añade el anticuerpo anti-CTGF humano al mismo y se permite que reaccione con él. Después, el resultado se deja reaccionar con un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo anti-IgG marcado con una enzima tal como la peroxidasa de rábano rústico (HRP), y se lava. Después se mide la absorbancia añadiendo un sustrato cromogénico (por ejemplo, un reactivo TMB en el caso de marcado con HRP). Además, la actividad de unión con el CTGF humano se puede medir con más detalle utilizando el análisis SPR. Cuando se lleva a cabo el análisis SPR, por ejemplo, se puede utilizar un sistema Biacore para medir la constante de la velocidad de asociación (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) entre el anticuerpo anti-CTGF humano y el CTGF humano, y de esta manera, se puede calcular una constante de disociación (K_D) a partir de la relación de las dos constantes. El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención también incluye un anticuerpo que también se une a un derivado del CTGF derivado de otros animales (por ejemplo, el CTGF de ratón), y también se puede medir la actividad de unión de los mismos por la proteína.

35 Adicionalmente, el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención tiene una actividad neutralizante contra el CTGF humano. Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la "actividad neutralizante" del anticuerpo significa una actividad para inhibir cualquier actividad biológica resultante del CTGF por la unión con el CTGF, y se puede evaluar en una o más actividades biológicas del CTGF como un índice. Ejemplos de dicha actividad neutralizante incluye una acción inhibitoria contra la síntesis de colágeno en los fibroblastos derivados del riñón (inhibición de fibrosis), y se puede evaluar la actividad neutralizante utilizando un método que se describe posteriormente en el Ejemplo.

45 Con el fin de evaluar los efectos del anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención con más detalle, también puede utilizarse un ensayo de la eficacia del anticuerpo *in vivo*. Por ejemplo, mediante la evaluación de la función del riñón utilizando un modelo de ratón con enfermedad renal crónica o un modelo de rata con nefritis como se describe en los Ejemplos posteriormente, se puede evaluar la eficacia del anticuerpo *in vivo*.

50 Además, los métodos para la evaluación de distintos tipos de estabilidad (por ejemplo, estabilidad térmica, estabilidad en almacenamiento a largo plazo y estabilidad a alta concentración) del anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención incluye la exploración calorimétrica diferencial y un método de medición de la formación de agregados durante el almacenamiento.

55 Preferentemente, el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención se puede adquirir fácilmente sintetizando un ADN que comprenda la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra mediante la SEQ ID NO: 10 y el ADN que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que se muestra mediante la SEQ ID NO: 4, y uniendo estos ADN a una clase adecuada de genes de región constante de anticuerpo humano, preferentemente un gen de la región constante Igy1 humana para la cadena pesada y un gen de la región constante de Igk humana para la cadena ligera, de manera que se construye un gen de anticuerpo humano completo utilizando un método conocido en la técnica, e introduciendo el gen de anticuerpo humano completo en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en una célula cultivada, cultivando la célula cultivada, y purificando un anticuerpo a partir del cultivo obtenido utilizando distintos métodos conocidos en la técnica. Preferentemente, el ADN que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra mediante la SEQ ID NO: 10 comprende la secuencia de bases que se muestra mediante la SEQ ID NO: 9. Preferentemente, el ADN que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de

aminoácidos de la región variable de cadena ligera que se muestra mediante la SEQ ID NO: 4 comprende la secuencia de bases que se muestra mediante la SEQ ID NO: 3.

5 Una cadena pesada preferida del anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención, que comprende la región variable de cadena pesada que se muestra en la SEQ ID NO: 10 y una región constante I γ 1 humana, es una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12. Una cadena ligera preferida de un anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención, que comprende la región variable de cadena ligera que se muestra en la SEQ ID NO: 4 y una región constante I γ k humana, es una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 8. Preferentemente, el ADN que comprende una secuencia de bases que codifica una cadena pesada del anticuerpo anti-CTGF humano que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12 comprende la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 11. Preferentemente, el ADN que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo anti-CTGF humano que se muestra en la SEQ ID NO: 8 comprende la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 7. Un anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante la SEQ ID NO: 8, incluye un 37-45-MH1 humano completo como se describe posteriormente en los Ejemplos.

20 La presente invención también comprende un anticuerpo anti-CTGF humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición desde 31 a 35 de la SEQ ID NO: 10, la CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición desde 50 a 66 de la SEQ ID NO: 10, y una CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición desde 99 a 108 de la SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición desde 24 a 35 de la SEQ ID NO: 4, una CDR2 que consiste la secuencia de aminoácidos en la posición desde 51 a 57 de la SEQ ID NO: 4, y una CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición desde 90 a 98 de la SEQ ID NO: 4. El anticuerpo anti-CTGF humano también se puede preparar por los expertos en la técnica de acuerdo con procedimientos tales como los que se han descrito anteriormente.

30 La presente invención también comprende fragmentos del anticuerpo anti-CTGF humano tales como un fragmento de la región variable de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab' y F(ab')₂, que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención y mantienen la actividad del anticuerpo. Cualquier experto en la técnica puede construir un anticuerpo de fusión del anticuerpo anti-CTGF humano o fragmento del anticuerpo y otro péptido o proteína y también se puede construir un anticuerpo modificado que tenga un agente de modificación unido al mismo, basándose en la presente invención. El otro péptido o proteína utilizando para la fusión no está específicamente limitado, a condición de que no reduzca la actividad de unión del anticuerpo; ejemplos de los mismos incluyen la seroalbúmina humana, distintos marcadores peptídicos, un péptido de motivo helicoidal artificial, proteínas de unión a maltosa, glutatión S transferasa, distintas toxinas, otros péptidos o proteínas capaces de promover la multimerización, y similares. El agente de modificación que se utiliza para la modificación no se limita específicamente, a condición de que no reduzca la actividad de unión del anticuerpo; ejemplos de los cuales incluyen el polietilenglicol, cadenas de azúcares, fosfolípidos, liposomas, compuestos de bajo peso molecular y similares.

45 El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención obtenido de esta manera se puede purificar adicionalmente como sea necesario, y se puede formular entonces de acuerdo con un método habitual, y de esta manera se puede utilizar para la prevención o tratamiento de enfermedades en las que el CTGF está implicado en la patogénesis, tales como enfermedades renales tal como la enfermedad renal crónica y nefropatía diabética, enfermedades vasculares proliferativas, cardiomiopatía, enfermedad fibroplástica hepática, fibrosis pulmonar, enfermedad de fibrosis cutánea, retinopatía diabética y cáncer.

50 El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención puede utilizarse preferentemente como agente terapéutico de enfermedades renales, y más preferentemente un agente terapéutico para enfermedades renales crónicas o nefropatía diabética. Ejemplos de las formulaciones para estos agentes terapéuticos o similares incluyen agentes parenterales tales como un agente de inyección y un agente de infusión, y se puede preferir la administración de los mismos utilizando la administración intravenosa, administración subcutánea, o similar. Además, para la formulación, con un intervalo farmacéuticamente aceptable se puede utilizar un aditivo o vehículo de acuerdo con estas formulaciones.

60 La cantidad de un anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención añadido a la formulación descrita anteriormente varía dependiendo de la gravedad de síntomas del paciente o la edad, la forma de dosificación de la formulación utilizada o el título de unión del anticuerpo y similares, por ejemplo, se pueden utilizar, aproximadamente de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg el anticuerpo.

65 La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención. La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que

codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención, y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención. El vector de expresión de la presente invención no se limita específicamente, a condición de que pueda expresar un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención de su región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera en distintas células huésped de células procariontas y/o células eucariotas y producen estos polipéptidos. Ejemplos de los mismos incluyen vectores plasmídicos, vectores víricos (por ejemplo, adenovirus, retrovirus) y similares. Preferentemente, el vector de expresión de la presente invención comprende un polinucleótido que comprende tanto un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención.

El vector de la presente invención puede comprometer un promotor unido operativamente a un gen que codifica el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención o su región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera. Un promotor para la expresión de un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o su región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera en una bacteria incluye, por ejemplo, el promotor Trp, promotor lac, promotor recA, promotor λ PL, promotor lpp, promotor tac, y similares, cuando el huésped es una bacteria del género *Escherichia*. Un promotor para la expresión en levaduras incluye, por ejemplo, PH05, promotor PGK, promotor GAP y promotor ADH, y algunos ejemplos de un promotor para la expresión en el género *Bacillus* incluye el promotor SL01, promotor SP02, promotor penP y similares. Cuando el huésped es una célula eucariota tal como una célula de mamífero, un promotor incluye el promotor derivado de SV40, promotor de retrovirus, promotor de choque térmico y similares.

Cuando se utiliza una bacteria, particularmente *Escherichia coli*, como célula huésped, el vector de expresión de la presente invención puede comprender adicionalmente un codón de inicio, una región terminadora y una unidad replicable. Cuando se utilizan una levadura, una célula animal o de insecto como el huésped, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de parada. En este caso, puede comprender una secuencia amplificadora, regiones no codificantes en el lado 5' y el lado 3' de un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o su región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera, una secuencia de señal de la secreción una unión de corte y empalme, una región de poliadenilación, una unidad replicable o similares. También, pueden comprender un indicador genético que es de uso común (por ejemplo, un gen resistente a la tetraciclina, un gen resistente a ampicilina, un gen resistente a la kanamicina, un gen resistente a la neomicina, gen de ácido dihidrofólico reductasa) de acuerdo con el uso pretendido.

La presente invención también proporciona un transformante en el que se ha introducido un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o su región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera. Dicho transformante se puede preparar, por ejemplo, transformando una célula huésped con el vector de expresión de la presente invención. Una célula huésped que se utiliza para preparar el transformante no se limita específicamente, a condición de que sea adecuado para el vector de expresión mencionado anteriormente y que se puede transformar; ejemplos de los mismos incluyen distintas células tales como células naturales o células establecidas artificialmente que se utilizan comúnmente en el campo de la técnica de la presente invención (por ejemplo, bacterias (bacterias del género *Escherichia*, bacterias del género *Bacillus*), levaduras (del género *Saccharomyces*, el género *Pichia* y similares), células de animales o células de insecto (por ejemplo, Sf9) y similares. La transformación se puede llevar a cabo por cualquier método conocido per se.

Preferentemente, el transformante de la presente invención es una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la presente invención y un polinucleótido que codifica una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención, o una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención. Más preferentemente, el transformante de la presente invención es una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención como se ha descrito anteriormente y un polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención, o una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención como se ha descrito anteriormente y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención.

La presente invención proporciona además un método para la producción de un anticuerpo anti-CTGF humano, que comprende la expresión de un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o la región variable de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del mismo en una célula huésped, es decir, utilizando dicho transformante. Preferentemente, la célula huésped utilizada en el método es una célula huésped transformada con el vector de expresión de la presente invención como se ha descrito anteriormente, y el vector de expresión puede comprender un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia que comprende la región

variable de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención, por separado o simultáneamente.

5 Cuando se produce el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención, el transformante se puede cultivar en un medio nutriente. El medio nutriente contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánico o fuente
 10 de nitrógeno orgánico, que son necesarios para el crecimiento del transformante. Ejemplos de la fuente de carbono incluye la glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa y similares; ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánico y nitrógeno orgánico incluye sales de amonio, nitratos, aminoácidos, agua de maceración de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, aglomerado de soja, extracto de patatas y similares, si se desea, puede contener otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro cálcico, fosfato dihidrógeno sódico, cloruro magnésico),
 15 vitaminas, antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina, kanamicina y similares) y similares).

El cultivo del transformante se lleva a cabo por un método conocido per se. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, pH del medio, y tiempo de cultivo se seleccionan adecuadamente. Por ejemplo, cuando el huésped es una célula animal, se puede utilizar un medio MEM (Science, Vol.122, p.501,1952), medio DMEM (Virology, Vol.8,
 20 p.396,1959), medio RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., Vol.199, p.519, 1967), medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.73, p.1, 1950) y similares que contengan aproximadamente de un 5 % a un 20 % de suero fetal bovino como medio. El pH del medio es preferentemente aproximadamente de 6 a 8, el cultivo se lleva a cabo a aproximadamente 30 °C a 40 °C durante aproximadamente 15 a 72 horas, y se puede llevar a cabo la aireación o agitado si es necesario. Cuando el huésped es una célula de insecto, por ejemplo, se puede mencionar un medio de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p.8404, 1985) y similares que contengan suero bovino fetal, y el pH del mismo es preferentemente aproximadamente de 5 a 8. El cultivo se lleva a cabo normalmente a aproximadamente 20 °C a 40 °C durante 15 a 100 horas, y se puede llevar a cabo la aireación o agitado si es necesario. Cuando el huésped es una bacteria, un actinomicetes, una levadura o un hongo filamentosos, por ejemplo, sería apropiado un medio líquido que contenga las fuentes de nutrientes descritas anteriormente. Un medio que tenga un pH de 5 a 8 es preferible. Cuando el huésped es *E. coli*, los ejemplos preferidos del medio incluyen, el medio LB, medio M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972) y similares. En este caso, el cultivo se puede llevar a cabo normalmente de 14 °C a 43 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas, mientras que se lleva a cabo la aireación o el agitado si es necesario. Cuando el huésped es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo puede llevarse a cabo normalmente de 30 °C a 40 °C durante aproximadamente 16 a 96 horas, mientras que se lleva a cabo la aireación o el agitado si es necesario. Cuando el huésped es una levadura, los ejemplos de medio incluyen el medio mínimo de Burkholder (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, p.4505, 1980), y el pH del medio es deseablemente de 5 a 8. El cultivo se lleva a cabo normalmente de aproximadamente 20 ° a 35 °C durante aproximadamente 14 a 144 horas, y se puede llevar a cabo la aireación o el agitado si es necesario.

35 Cultivando un transformante como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención se puede recuperar, preferentemente aislado y purificado a partir del transformante. Ejemplos del método de aislamiento y purificación incluyen métodos basados en las diferencias de solubilidad, tal como precipitación proteica por adición de sal, y precipitación en disolventes; métodos basados en las diferencias de peso molecular, tal como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, y electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato de dodecil sódico; métodos basados en la carga eléctrica, tal como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía en hidroxil apatita; métodos basados en la afinidad específica, tal como cromatografía de afinidad; métodos basados en las diferencias de hidrofobia, tal como cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa; métodos basados en las diferencias del punto isoeléctrico, tales como foco isoeléctrico; y similares.

45 Aunque la presente invención se ha descrito en general anteriormente, se proporcionan en el presente documento ejemplos específicos solo para un mejor entendimiento de la presente invención, Estos ejemplos tienen fines solamente ilustrativos y no limitan al alcance de la presente invención.

50 Ejemplos

Los procedimientos que implican el uso de un kit o reactivo y similares se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo adjunto a menos de que se establezca otra cosa.

55 Ejemplo 1: Adquisición de la proteína CTGF derivada de distintas fuentes

Los presentes inventores adquirieron una proteína CTGF humana como antígeno para preparar el anticuerpo anti-CTGF humano. El gen de longitud completa (SEQ ID NO: 13) del CTGF se ligó en un vector de expresión (pcDNA3.1; Invitrogen), y el vector preparado de esta manera se introdujo genéticamente en una célula 293 FreeStyle (Invitrogen) utilizando el reactivo MAX FreeStyle (Invitrogen) como reactivo introductor del gen. Esta célula se cultivó en un sistema de cultivo libre de suero utilizando un Medio de Expresión 293 FreeStyle (Invitrogen), y entonces se consiguió un sobrenadante del cultivo que incluía la proteína CTGF humana. La proteína se purificó del sobrenadante del cultivo así adquirido, utilizando una columna de heparina HiTrap y una columna CM (GE Healthcare, Japón), y se utilizó en el experimento de la siguiente manera. Las proteínas CTGF de rata y mono se adquirieron utilizando el mismo método.

Ejemplo 2: Inmunización del ratón Veloclmmune

Un anticuerpo para el CTGF humano se adquirió por inmunización para un ratón Veloclmmune. Con el fin de aumentar la diversidad de un anticuerpo que se va a obtener, los presentes inventores han investigado una pluralidad de métodos de inmunización, vías de administración, adyuvante, periodos de inmunidad, y similares.

5 Como inmunógeno se utilizó CTGF humano purificado y mezclado con un adyuvante para llevar a cabo la inmunización. Como vía de administración, la administración en la almohadilla plantar y la administración intraperitoneal se investigó. Como adyuvante se investigaron TiterMax Gold (CytRx Corporation), un adyuvante completo de Freund (Sigma) y un adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Además, como estimulante que se añadió, se investigaron el oligonucleótido CpG y gel de fosfato de aluminio (fabricado por BRENNTAG). Como periodo de inmunización, se llevó a cabo la inmunización durante 3 semanas a 14 semanas. Después de llevar a cabo la inmunización varias veces, los ratones se sometieron a extracción de sangre a partir de la vena caudal para controlar el título, y de esta manera se escogieron los ratones que producían anticuerpos que se unían el CTGF humano.

15 La titulación se midió utilizando el método de ELISA posterior. Se añadieron 20 µl de solución salina de tampón de fosfato (PBS) con CTGF humano (1 µg/ml) a una placa Maxisorp 384 (Nunc Inc.), y se inmovilizó incubándolo durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa se lavó una vez con 100 µl de solución de lavado (TBST: 0,05 % de tampón Tris que contiene Tween-20), y después se añadieron 100 µl de agente bloqueante (PCS que contenía un 1 % de BSA) al mismo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar una vez con 100 µl de solución de lavado TBST, se preparó una serie de diluciones de plasma en la muestra de sangre y se añadieron al mismo. Después de una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, y un lavado con 100 µl de una solución de lavado de TBST, se añadió al mismo un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con una peroxidasa de rábano rusticano (HRP-anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón; Zymed Laboratories Inc.) que se han diluido 5000 veces con un 0,1 % de solución de lavado de TBST que contenía BSA (20 µl). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se llevó a cabo un lavado con solución de lavado de TBST tres veces. Después de añadir 40 µl de reactivo cromogénico TMB (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) al mismo y dejarlo en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añadió 40 µl de solución de parada (2 mol/l de ácido sulfúrico) para parar la reacción, y se midió la absorbancia a 450 nm.

30 Ejemplo 3: Preparación de hibridoma productor de anticuerpo anti-CTGF humano

La inmunización final (administración intravenosa o intraperitoneal de un antígeno) se llevó a cabo para un ratón escogido comprobando el aumento del título de anticuerpo. Se preparó un hibridoma por recolección de linfocitos retirando el bazo y ganglios linfáticos o ratones inmunizados de acuerdo con un método convencional, y se fusionaron celularmente con una célula de mieloma SP2/0 de ratón. El hibridoma se sometió a dilución limitante y monoclonación, y entonces se purificó el anticuerpo a partir del sobrenadante utilizando una columna de proteína A y proteína G (GE Healthcare, Japón).

40 Ejemplo 4: Ensayo de ELISA

Los presentes inventores evaluaron la especificidad de unión del anticuerpo para CTGF utilizando un método de ELISA. Se añadieron 20 µl de solución PBS con CTGF humano (1 µg/ml) a una placa Maxisorp 384 (Nunc, Inc.), y se inmovilizó incubándolo durante una noche a 4 °C. Al día siguiente la placa se lavó una vez con 100 µl de solución de lavado (TPBS: un 0,05 % de PBS que contenía Tween-20, y después se añadieron 100 µl de agente de bloqueo (un 1 % de PBS que contenía BSA) al mismo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar una vez con 100 µl de la solución de lavado TBST, se prepararon series de diluciones apropiadas de la muestra de anticuerpo purificado y se añadieron a la placa. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lavó tres veces con 100 µl de solución de lavado TBST, y se añadió al mismo un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, marcado con una peroxidasa de rábano rusticano (HRP-anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón; Zymed Laboratories, Inc.) que se había diluido 5000 veces con una solución de lavado TBST que contenía un 0,1 % de BSA (20 µl)). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lavó tres veces con 100 µl de solución de lavado TBST. Después de añadir 40 µl del reactivo cromogénico TMB (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) al mismo y dejarlo en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añadieron 40 µl de solución de parada (2 mol/l de ácido sulfúrico) para parar la reacción, y se midió la absorbancia a 450 nm. Cada uno de los anticuerpos se ensayó por duplicado, y se analizó la CE50 por ajuste a la curva.

Como resultado, se confirmó que un anticuerpo al que se hace referencia como 37-45 tenía una alta actividad de unión (CE50: 1,6 ng/ml).

60 Ejemplo 5: Secuenciación del anticuerpo

Para el anticuerpo identificado 37-45, los presentes inventores clonaron un gen que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo a partir del hibridoma. Se extrajo el ARN del hibridoma, y se preparó un ADNc utilizando el kit de amplificación de ADNc (SMARTer RACE cDNA Amplification kit; Clontech). Posteriormente, las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera se alargaron y amplificaron utilizando PCR. Los productos de la PCR se recombinaron con un vector para subclonar los productos de la PCR tal como pCR3.1-TOPO (Invitrogen), y

entonces se secuenció el gen utilizando un secuenciador (ABI-PRISM 3100; Applied Biosystems).

La secuencia de bases determinada de la región variable de cadena pesada del 37-45 se muestra mediante la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra mediante la SEQ ID NO: 2, y la secuencia de terminada de la región variable de cadena ligera del 37-45 se muestra mediante la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra mediante la SEQ ID NO: 4.

Ejemplo 6. Preparación de un anticuerpo completamente humano

Para el anticuerpo descrito anteriormente, la región variable se deriva de un ser humano y la región constante se deriva de un ratón. Por lo tanto, los presentes inventores sustituyeron la región constante derivada de un ratón por la región constante derivada de un ser humano para preparar un anticuerpo completamente humano (el 37-45 completamente humano). Específicamente, se unió una secuencia de señal en el lado 5' del gen de la región variable de cadena pesada del anticuerpo y se unió el gen de la región constante de la Igy1 humana (Man Sung Co., etc. (1992) J Immunol. Vol. 148 (4): 1149-1154) en el lado 3' del gen de la región variable de cadena pesada del anticuerpo. El gen de cadena pesada se insertó en un vector GS (Lonza Biologics) pEE6.4. Al insertarlo, un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BbvCI del gen se convirtió en una secuencia de ADN que no afecta a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Además, se unió una secuencia de señal en el lado 5' del gen de la región variable de cadena ligera del anticuerpo y se unió el gen de la región constante de la cadena κ humana (Man Sung Co., etc., *supra*) al lado 3' del gen de la región variable de cadena ligera del anticuerpo. El gen de cadena ligera se insertó en un vector GS pEE12.4.

Para la cadena pesada del 37-45 totalmente humano que se prepara, la secuencia de bases se muestra mediante la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos se muestra mediante la SEQ ID NO: 6, y para la cadena ligera del anticuerpo, la secuencia de bases se muestra mediante la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos se muestra mediante la SEQ ID NO: 8.

Ejemplo 7: Preparación de una variante del sitio de glicosilación de la región variable

El aminoácido de la región variable de cadena pesada del 37-45 completamente humano que se ha descrito anteriormente, incluye una secuencia de un motivo de glicosilación tipo N de N-X(T/S). Específicamente, en la región variable de cadena pasada que se muestra en la SEQ ID NO: 2, el Asn de la posición 58 de acuerdo con la numeración de Kabat se corresponde con el sitio de glicosilación. Si el sitio de glicosilación está presente, la adición de cadenas de azúcares al anticuerpo se produce durante el cultivo celular, pero se sabe que la adición de cadenas de azúcares depende de las condiciones de cultivo o los huéspedes de expresión. Es decir, incluso con las mismas células productoras de anticuerpo así establecidas, es posible que haya una variación en el grado de adición de cadenas de azúcares según las condiciones de cultivo (un medio, concentración celular, y similares), y también existe la posibilidad de que sea difícil adquirir un producto de anticuerpo médico que tenga una calidad uniforme. Por lo tanto, los presentes inventores prepararon un anticuerpo completamente humano (37-45-MH1 completamente humano) en el que se habían introducido mutaciones en la región variable de cadena pesada del 37-45 completamente humano.

Para la región variable de cadena pesada del 37-45-MH1 completamente humano preparado, la secuencia de bases se muestra mediante la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos se muestra mediante la SEQ ID NO: 10. Para la cadena pesada del 37-45-MH1 completamente humano preparado, la secuencia de bases se muestra mediante la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos se presenta mediante la SEQ ID NO: 12. La cadena ligera del 37-45-MH1 completamente humano es la misma que la cadena ligera del 37-45 completamente humano.

Las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 37-45-MH1 completamente humano están en una región en las posiciones de la 31 a 35, 50 a 65 y 95 a 102 de la región variable de cadena pesada basándose en la numeración de Kabat, respectivamente, que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 31 a 35, 50 a 66, y 99 a 108 de la SEQ ID NO: 10, respectivamente. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 37-45-MH1 completamente humano es una región de las posiciones del 24 a 34, 50 a 56, y 89 a 97 de la región variable de cadena ligera basándose en la numeración de Kabat, respectivamente, que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones de la 24 a 35, 51 a 57, y 90 a 98 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente.

Ejemplo 8: Expresión y purificación del anticuerpo completamente humano

El vector GS en el que se habían insertado los genes de la cadena pesada y cadena ligera de cada anticuerpo como se ha descrito anteriormente, el 37-45 completamente humano y el 37-45-MH1 completamente humano, se escindió con enzimas de restricción, NotI y PvuI, y se ligaron utilizando el Kit Ligation-Convenience (NIPPONGENE) o un Ligation-high (TOYOBO) para construir un vector GS en el que ambos genes de la cadena pesada y la cadena ligera, se habían insertado. Este vector codifica las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa y una glutamina sintetasa, y se transfectó en células CHO-K1SV para expresar el anticuerpo. El sobrenadante del cultivo se purificó con una columna de Proteína A o Proteína G (GE Healthcare, Japón) para obtener un anticuerpo purificado de cada

anticuerpo completamente humano.

Ejemplo 9: Ensayo de ELISA del anticuerpo completamente humano

5 Los presentes inventores evaluaron la especificidad de unión del 37-45 completamente humano y el 37-45-MH1 completamente humano preparados en los ejemplos anteriores para el CTGF de ser humano, ratón, rata y mono utilizando un método ELISA. Aquí, se utilizó el mismo método descrito en el Ejemplo 4, excepto que se utilizó un anticuerpo de conejo anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano rústico (HRP-anticuerpo de conejo anti-IgG humano; DAKO) que estaba diluido 500 veces con una solución de lavado TBST que contenía un 0,1 % de BSA como anticuerpo secundario. El ensayo de cada anticuerpo se llevó a cabo por duplicado y se analizó la CE50 por ajuste a la curva.

10 Como resultado se descubrió que todos los anticuerpos completamente humanos tenían los mismos grados de capacidad de unión para el CTGF humano, de ratón, rata y mono.

15 Tabla 1: Actividad de unión del anticuerpo completamente humano para distintos CTGF

[Tabla 1]

	EC50 (ng/ml) de 37-45 completamente humano	EC50 (ng/ml) de 37-45-MH1 completamente humano
CTGF humano	13,2	10,4
CTGF de ratón	12,4	9,2
CTGF de rata	13,1	9,2
CTGF de mono	12,5	8,6

20 Ejemplo 10: Evaluación de la actividad de unión por análisis SPR

Con el fin de medir la actividad de unión específica de antígeno del 37-45-MH1 completamente humano con más detalle, los presentes inventores llevaron a cabo un análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR). En el presente ejemplo, se utilizó un anticuerpo CLN1 (Documento de Patente 2) anti-CTGF humano como anticuerpo de comparación.

25 En el análisis SPR, se utilizó un Biacore 2000 (GE Healthcare, Japón) para llevar a cabo el análisis. Se inmovilizó un anticuerpo anti-CTGF en la superficie de un Chip Sensor CM5 utilizando un kit de captura de anticuerpo humano y un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare, Japón). Se hizo una dilución en serie del CTGF humano adquirido en el Ejemplo 1 mediante solución en HBS-EP (GE Healthcare, Japón). Se añadieron 100 μ l de la dilución a la vía de flujo a un caudal de 50 μ l/min. Mediante este sistema de medición, se calcularon la constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d), y la constante de disociación (KD) de la proteína CTGF humana y el anticuerpo anti-CTGF utilizando un software de análisis de datos (BIA Evaluation).

35 Tabla 2: Actividad de unión del CTGF humano del 37-45-MH1 completamente humano mediante análisis SPR

[Tabla 2]

	KD (M)	Kd (1/s)
37-45-MH1 completamente humano	$3,7310^{-11}$	$1,6310^{-4}$
CLN1	$4,6310^{-10}$	$3,7310^{-3}$

40 Como resultado, se descubrió que el 37-45-MH1 completamente humano tiene aproximadamente 12 veces o más de actividad de unión por el CTGF humano que el anticuerpo CLN1.

Ejemplo 11: Acción inhibitoria de la síntesis de colágeno en células derivadas de riñón de rata

45 Los presentes inventores investigaron el efecto inhibitorio de la síntesis de colágeno inducida por TGF β en el fibroblasto NRK-49F de rata con el fin de medir la acción neutralizante específica de antígeno del 37-45-MH1 completamente humano. En el presente ejemplo, se utilizó el CLN1 como anticuerpo de comparación.

50 Las células NRK-49F (disponibles en la ATCC) producen CTGF por la adición de TGF β . Las células NRK-49F se sembraron en una palca de 24 pocillos en un medio MDM que contenía un 10 % de FCS (5×10^4 células), y después de 24 horas, se reemplazó el medio con un DMEM que contenía un 0,01 % de FCS (500 μ l). Además, después de 24 horas, se añadió TGF β (R&D Systems; 1 ng/ml) al medio. 1 hora antes de la adición de TGF β , se añadieron los anticuerpos anti-CTGF humano, el 37-45-MH1 completamente humano o el CLN1, (a tres grupos a 1 μ g/ml, 3 μ g/ml

y 10 µg/ml). Después de 72 horas, se recuperó el sobrenadante y se sometió a SDS-PAGE, y se llevó a cabo el análisis de transferencia de Western de acuerdo con un método ordinario utilizando un anticuerpo anti-colágeno I (Abcam plc). Como resultado, se descubrió que el 37-45-MH1 completamente humano tenía una fuerte capacidad para la inhibición de la síntesis de colágeno, en comparación con el CLN1 en una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 12: Ensayo de evaluación de la función renal mediante un modelo renal remanente en ratón

La glomeruloesclerosis y degeneración renal tubular son un hallazgo, que aparece comúnmente en varios trastornos renales que producen enfermedades crónicas. Estas enfermedades renales crónicas se pueden investigar en el modelo de riñón remanente de ratón que presenta trastornos renales progresivos. En este modelo, se aplica una carga al riñón residual por una nefrectomía unilateral de 2/3 de un riñón y nefrectomía total contralateral (5/6 de nefrectomía), induciendo de esta manera una proteinuria y reducción significativa de las funciones del riñón, y se presenta una esclerosis glomerular histopatológica o degeneración tubular renal y se presenta una fibrosis intestinal leve (véase, por ejemplo, *Kidney International*, 64, 350-355, 2003).

Se llevó a cabo una nefrectomía 5/6 en referencia a un método de Zhang, et al. (*Kidney International*, 56, 549-558, 1999). Se anestesió un ratón ICR (Japan SLC, Inc., Hamamatsu-shi, Shizuoka-ken) macho de 9 semanas de edad mediante administración intra-peritoneal de pentobarbital (50 mg/kg), y se extirpó 1/3 de la cabeza y 1/3 caudal del riñón izquierdo. Una semana después de la primera cirugía, se anestesió el ratón mediante administración intra-peritoneal de pentobarbital (50 mg/kg), y el riñón derecho se retiró completamente para completar la nefrectomía 5/6.

Se llevó a cabo la recolección de muestras de orina y de sangre una semana después de la nefrectomía 5/6, y se midieron la excreción de proteína urinaria y los parámetros de la función renal (concentración de creatinina en el suero y aclaramiento de creatinina). La medición de la concentración proteica se llevó a cabo por un método Bradford (Bio-Rad Laboratories). La concentración de creatinina se midió utilizando CRE-EN Kainos (Kainos Laboratories, Inc.). La tasa de excreción de proteína urinaria se calculó corrigiendo la concentración de proteína en orina (en mg/ml) con la concentración de creatinina (en mg/dl) La tasa de excreción de proteína urinaria, la concentración de creatinina en el suero, y el aclaramiento de creatinina se tomaron como indicadores, y de esta manera, se dividieron los grupo en el grupo tratado con disolvente (administración de un tampón de fosfato con un pH 7,4) y el grupo de administración de anticuerpo (15 ratones por grupo). Los ensayos comenzaron ajustando las dosis de anticuerpos en tres grupos, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg y 2 mg/kg. El tampón de fosfato y el 37-45-MH1 completamente humano se inyectaron por vía subcutánea en el dorso una vez a la semana (seis dosis en total) Al inicio del ensayo, las semanas 4 y 6 dl inicio del ensayo, se recolectaron las muestras de orina y las muestras de sangre, y se midió la tasa de excreción de proteína urinaria, la concentración de creatinina en el suero, y el aclaramiento de creatinina.

Para la tasa de excreción de proteína urinaria, en el momento del inicio del ensayo, en el grupo tratado con disolvente, la tasa de proteína urinaria aumentaba, en comparación con el grupo normal (grupo normal $5,1 \pm 0,4$; grupo tratado con disolvente $9,7 \pm 0,7$ ($P < 0,01$)). También, a la semana 4 y 6 desde el inicio del ensayo, en el grupo tratado con disolvente, la tasa de excreción de proteína urinaria aumentaba, en comparación con el grupo normal. Por otra parte, en los grupos tratados con anticuerpo (grupo de 1 mg/kg y grupo de 2 mg/kg), aunque no había una diferencia estadísticamente significativa, la tasa de excreción de proteína urinaria disminuía de una manera dependiente de la dosis, en comparación con el grupo tratado con disolvente.

Para la concentración de creatinina en el suero, en el momento del inicio del ensayo, en el grupo tratado con disolvente, la concentración de creatinina en el suero aumentaba, en comparación con el grupo normal (grupo normal $0,36 \pm 0,013$ mg/dl; el grupo tratado con disolvente $0,53 \pm 0,016$ mg/dl ($P < 0,01$), la semana 6: grupo normal $0,31 \pm 0,016$ mg/dl; grupo tratado con disolvente $0,81 \pm 0,126$ mg/dl ($P < 0,05$)). En los grupos tratados con anticuerpo, para el grupo de 0,5 mg/kg, aunque no había diferencia significativa, la concentración de creatinina en el suero disminuía las semanas 4 y 6, en comparación con el grupo tratado con disolvente. Además, en el grupo de 1 mg/kg y el grupo de 2 mg/kg, el aumento de la concentración de creatinina en el suero estaba inhibido significativamente, en comparación con el grupo tratado con disolvente (semana 4: grupo de 1 mg/kg $0,51 \pm 0,022$ mg/dl ($P < 0,05$); grupo de 2 mg/kg $0,51 \pm 0,015$ mg/dl ($P < 0,05$), semana 6: grupo de 1 mg/kg $0,55 \pm 0,043$ mg/dl ($P < 0,05$); grupo de 2 mg/kg $0,49 \pm 0,024$ mg/dl ($P < 0,01$)).

Para el aclaramiento de creatinina (concentración de creatinina urinaria x cantidad de orina durante 2 horas/concentración de creatinina en el suero), en el momento del inicio del ensayo, en el grupo tratado con disolvente, la disminución del aclaramiento de creatinina se confirmó en comparación con el grupo normal (grupo normal $1,8 \pm 0,18$; grupo tratado con disolvente $1,3 \pm 0,08$ ($P < 0,01$)). A continuación, también las semanas 4 y 6, en el grupo tratado con disolvente, el aclaramiento de creatinina disminuía en comparación con el grupo normal (semana 4: grupo normal $2,1 \pm 0,16$; grupo tratado con disolvente $1,6 \pm 0,16$, semana 6: grupo normal $2,8 \pm 0,29$; grupo tratado con disolvente $1,4 \pm 0,17$ ($P < 0,001$)). Para los grupos tratados con anticuerpo, en el grupo de 0,5 mg/kg, la inhibición de la disminución del aclaramiento de creatinina no se confirmó en comparación con el grupo tratado con disolvente. Por otra parte, en el grupo de 1 mg/kg, las semanas 4 y 6, la disminución del aclaramiento de creatinina estaba significativamente inhibido, en comparación con el grupo tratado con disolvente (semana 4: grupo

tratado con disolvente $1,6 \pm 0,16$, semana 6: grupo normal $2,8 \pm 0,29$; grupo tratado con disolvente $1,4 \pm 0,17$ ($P < 0,001$). Para los grupos tratados con anticuerpo, en el grupo de 0,5 mg/kg, la inhibición del aclaramiento de creatinina no se confirmó en comparación con el grupo tratado con disolvente. Por otra parte, en el grupo de 1 mg/kg, las semanas 4 y 6, la disminución del aclaramiento de creatinina estaba significativamente inhibido, en comparación con el grupo tratado con disolvente (semana 4: grupo tratado con disolvente $1,6 \pm 0,16$; grupo de 1 mg/kg $2,1 \pm 0,11$ ($P < 0,05$), semana 6: grupo tratado con disolvente $1,4 \pm 0,17$; grupo de 1 mg/kg $2,0 \pm 0,18$ ($P < 0,05$)). Además, en el grupo de 2 mg/kg, la semana 6, la disminución del aclaramiento de creatinina estaba significativamente inhibida, en comparación con el grupo tratado con disolvente (semana 4: grupo tratado con disolvente $1,6 \pm 0,16$; grupo de 1 mg/kg $2,1 \pm 0,11$ ($P < 0,05$), semana 6: grupo tratado con disolvente $1,4 \pm 0,17$; grupo de 1 mg/kg $2,0 \pm 0,18$ ($P < 0,05$)). Además, en el grupo de 2 mg/kg, la semana 6, la disminución del aclaramiento de creatinina estaba significativamente inhibida, en comparación con el grupo tratado con disolvente (semana 6: grupo tratado con disolvente $1,4 \pm 0,17$; grupo de 2 mg/kg $1,9 \pm 0,14$ ($P < 0,05$)).

A partir de estos resultados, se confirmó que el 37-45-MH1 completamente humano inhibe la reducción de las funciones renales en un modelo de enfermedad renal crónica.

Ejemplo 13: Ensayo de evaluación farmacológica en modelos de nefritis en ratas

Los modelos anti-Thy 1.1 de rata se establecieron como modelos de glomerulonefritis proliferativa mesangial, con las condiciones patológicas expresadas por la inyección de anticuerpo contra los antígenos Thy en la superficie de las células mesangiales del glomérulo renal (véase, por ejemplo, Yamamoto y Wilson, 1987 *Kidney Int.* 32:514-25, Morita, et al., 1998 *Am J Kidney Dis* 31:559-73). En los presentes modelos, después de la lisis de las células mesangiales, aumenta la proliferación celular mesangial y aumentan las matrices extracelulares, y el nivel de proteína urinaria aumenta (véase, por ejemplo, Floege, et al., 1991 *Kidney Int.* 40:477-88, Ito, et al., 2001 *J Am Soc Nephrol.* 12:472-84). Los modelos anti-Thy 1.1 son similares a la nefropatía por IgA o púrpura de Henoch-Schonlein en seres humanos, y el progreso de las condiciones patológicas se pueden predecir utilizando los modelos con proteinuria como un indicador (véase, por ejemplo, Kasuga, et al., 2001 *Kidney Int.* 60:1745-55, Liu, et al., 2007 *Nephron Exp Nephrol.* 105:e65-74).

Una solución de anticuerpo anti-Thy 1.1 (anticuerpo monoclonal anti-CD90 de rata (Thy 1.1)-ascitis; CEDARLANE) se preparó mediante solución salina fisiológica a 0,1 g/ml. Se expresó la nefritis mediante la administración intravenosa de la solución de anticuerpo a las ratas (200 µl por 100 g de peso corporal). Después de 4 horas de la administración de la solución de anticuerpos anti-Thy 1.1, se administraron por vía intravenosa el 37-45-MH1 completamente humano (0,5 mg/kg, 1 mg/kg o 2 mg/kg) o disolvente (PBS). Se llevó a cabo la recolección de orina durante 24 después de 3 a 4 días de la inducción de la patogénesis, y se midieron la cantidad de excreción proteica urinaria en 24 horas (UP) y la tasa de expresión proteica urinaria (UP/uCr). La concentración proteica urinaria (mg/ml) se corrigió con la concentración de creatinina urinaria (mg/dl). Los resultados se muestran en la Tabla 3 (UP) y la Tabla 4 (UP/uCr).

Tabla 3: UP

[Tabla 3]

	UP (mg/día)	Tasa inhibidora (%) vs grupo administrado con disolvente	Valor de p
Grupo de animales normales	1,9	100,0	
Grupo administrado con disolvente (PBS)	114,3	0,0	P<0,001 #
37-45-MH1 completamente humano 0.5 mg/kg	115,2	-0,8	
37-45-MH1 completamente humano 1 mg/kg	95,5	16,8	
37-45-MH1 completamente humano 2 mg/kg	83,8	27,2	p=0,029 *
#: vs el grupo de animales normales por el ensayo t			
*: vs el grupo administrado con disolvente por el ensayo de Dunnett			

Tabla 4: UP/uCr

[Tabla 4]

	UP/uCr (mg/mg)	Tasa inhibidora (%) vs grupo administrado con disolvente	Valor de p
Grupo de animales normales	0.315	100.0	
Grupo administrado con disolvente (PBS)	33.865	0.0	p<0.001 #

37-45-MH1 completamente humano 0.5 mg/kg	26.280	22.6	
37-45-MH1 completamente humano 1 mg/kg	22.487	33.9	p=0.037 *
37-45-MH1 completamente humano 2 mg/kg	18.427	46.0	p=0.0039 *
#: vs el grupo de animales normales por el ensayo t *: vs el grupo administrado con disolvente por el ensayo de Dunnett			

Como resultado, el 37-45-MH1 completamente humano inhibía la proteinuria de una manera dependiente de la dosis, y las tasas inhibitoras eran en el grupo de 2 mg/kg del 27,2 % y 46,0 % frente al grupo al que se administró disolvente, respectivamente, con los índices de UP y UP/uCr.

5 A continuación, con el fin de identificar la diferencia con CLN1 en la fuerza de acción, se utilizaron los mismos modelos para la evaluación. El procedimiento de evaluación era el mismo que anteriormente. Para la evaluación, con referencia a las dosis que eran eficaces anteriormente, se utilizó el 37-45-MH1 completamente humano a 2 mg/kg, como control positivo, y se utilizaron 2 mg/kg y una dosis de 10 veces el mismo, 20 mg/kg, de CLN1. 10 Además, con el fin de investigar la implicación de una reacción inmunitaria no específica por el tratamiento con anticuerpos heterogéneos, se utilizaron como controles 2 mg/kg y 20 mg/kg de anticuerpos IgG humana (anticuerpo anti-KLH (hemocianina de lapa californiana): se obtuvo inmunizando un ratón VelocImmune con KLH y preparándolos como una IgG1 completamente humana de la misma manera que el 37-45-MH1 completamente humano). Los resultados se muestran en la Tabla 5 (UP) y Tabla 6 (UP/uCr).

15 Tabla 5: UP

[Tabla 5]

	UP (mg/día)	Tasa inhibitora (%) vs grupo administrado con disolvente	Valor de p	Tasa inhibitora (%) vs grupo administrado con IgG	Valor de p
Grupo de animales normales	0,8	100,0		100,0	
Grupo administrado con disolvente (PBS)	111,1	0,0	p<0,001 #		
Control IgG 2 mg/kg	114,5	-3,1		0,0	p<0,001 #
Control IgG 20 mg/kg	113,4	-2,1		0,0	p<0,001 #
CLN1 2 mg/kg	97,2	12,6	p=0,45 *	15,2	p=0,22 &
CLN1 20 mg/kg	107,3	3,5	p=0,79 *	5,4	p=0,53 \$
37-45-MH1 completamente humano 2 mg/kg	79,0	29,1	p=0,044 *	31,2	p=0,0011 &
#: vs el grupo de animales normales por el ensayo t *: vs el grupo administrado con disolvente por el ensayo t &: vs el grupo de control IgG 2 mg/kg por el ensayo t \$: vs el grupo de control IgG 20 mg/kg por el ensayo t					

20 Tabla 6: UP/uCr

[Tabla 6]

	UP (mg/día)	Tasa inhibitora (%) vs grupo administrado con disolvente	Valor de p	Tasa inhibitora (%) vs grupo administrado con IgG	Valor de p
Grupo de animales normales	0,3	100,0		100,0	

Grupo administrado con disolvente (PBS)	46,1	0,0	p<0,001 #		
Control IgG 2 mg/kg	52,2	-13,4		0,0	p<0,001 #
Control IgG 20 mg/kg	42,7	7,5		0,0	p<0,001 #
CLN1 2 mg/kg	36,3	21,5	p=0,18 *	30,8	p=0,030 &
CLN1 20 mg/kg	41,8	9,5	p=0,49 *	2,2	p=0,82 \$
37-45-MH1 completamente humano 2 mg/kg	28,1	39,2	p=0,0092 *	46,4	p<0,001 &
#: vs el grupo de animales normales por el ensayo t *: vs el grupo administrado con disolvente por el ensayo t &: vs el grupo de control IgG 2 mg/kg por el ensayo t \$: vs el grupo de control IgG 20 mg/kg por el ensayo t					

Como resultado, las condiciones patológicas se expresaban en sustancialmente el mismo grado que el experimento previo. Además, 2 mg/kg de 37-45-MH1 completamente humano presentaba sustancialmente la misma tasa e inhibición que se evaluó en el experimento previo, y las tasas inhibitoras eran 29,1 % y 39,2 %, respectivamente, con los índices de UP y Up/uCr, en el caso de utilizar el grupo al que se administra el disolvente como control.

Por otra parte, el CLN1 tenía menos acción inhibitora sobre la proteinuria, en comparación con el 37-45-MH1 completamente humano (las tasas inhibitoras vs el grupo al que se administra disolvente eran de 12,6 % y 21,5 %, respectivamente, con los índices de UP y UP/uCr a 2 mg/kg, y las tasas inhibitoras vs el grupo al que se administra disolvente eran de 3,5 % y 9,5 %, respectivamente, con los índices de UP y UP/uCr a 20 mg/kg). Además, para los anticuerpos IgG1 humanos, había una acción sustancialmente pequeña sobre la proteinuria.

A partir de esto, se confirmó que el 37-45-MH1 completamente humano tiene una fuerte acción inhibitora, en comparación con CLN1.

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo anti-CTGF humano de la presente invención es útil para la prevención o tratamiento de distintas enfermedades en las que el CTGF humano está implicado en la patogénesis, en un intervalo de enfermedades renales tales como la enfermedad renal crónica y nefropatía diabética.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Astellas Pharma Inc.
- <120> Nuevo anticuerpo anti-CTGF humano
- <130> A12037A00
- <150> JP2011-281811
- <151> 22-12-2011
- <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Gen VH del anticuerpo anti-CTGF humano

ES 2 665 851 T3

<400> 1

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccocta acagtgggtg cacaaactat      180
tcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcctgtg attactgtgc gagagggagt      300
aagtggaact acccttttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca      357
    
```

5

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> VH del anticuerpo anti-CTGF humano

15

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

20

<210> 3
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Gen VL del anticuerpo anti-CTGF humano

<400> 3

ES 2 665 851 T3

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtotttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gaagggccac tggcatocca      180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgtagtgta tttctgtcag cagtatgtca gcacaccgtg gacgttcggc      300
caagggacca aggtggaaat caaacgg                                           327

```

5 <210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VL del anticuerpo anti-CTGF humano

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

```

15 <210> 5
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Gen de cadena H del anticuerpo anti-CTGF humano

<400> 5

ES 2 665 851 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
tcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtocatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggtgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt 300
aagtggaact acccttttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aacoggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acottcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc ttagtagcgt ggtgaccgtg ccctocagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccacgcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccctg tggtcagcgt cctcacccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagcgggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

- <210> 6
- <211> 449
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Cadena H del anticuerpo anti-CTGF humano
- <400> 6

ES 2 665 851 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

ES 2 665 851 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

ES 2 665 851 T3

<210> 7
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Gen de la cadena L del anticuerpo anti-CTGF humano

<400> 7

10

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gaagggccac tggcatocca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgtagtgta tttctgtcag cagtatgtca gcacaccgtg gacgttoggc      300
caagggacca aggtggaaat caaacggact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag      648
    
```

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cadena L del anticuerpo anti-CTGF humano

<400> 8

20

ES 2 665 851 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Val Ser Thr Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 357
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen VH del anticuerpo anti-CTGF humano

10 <400> 9

ES 2 665 851 T3

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
toctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat      180
gcccaagaag ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggetgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagggagt      300
aagtggaact acccttttga ctactggggc cagggaaacc tggtcacctg ctctca      357

```

5 <210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VH del anticuerpo anti-CTGF humano
 <400> 10

```

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

15 <210> 11
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cadena H del anticuerpo anti-CTGF humano
 <400> 11

ES 2 665 851 T3

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggccgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgtattgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat      180
gccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcctgt attactgtgc gagagggagt      300
aagtggaact acccttttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcagcc      360

tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc      420
acageggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg      480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga      540
ctctactccc ttagtagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac      600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagccaaa      660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcocagcac ctgaactcct ggggggaccg      720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gcaaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaocagg actggctgaa tggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatoccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag     1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg     1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga                                     1350

```

<210> 12
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena H del anticuerpo anti-CTGF humano

10

<400> 12

ES 2 665 851 T3

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

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

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

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

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

ES 2 665 851 T3

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

ES 2 665 851 T3

```

atgaccgccg ccagtatggg ccccgctcgc gtcgccttcg tggtcctcct cgccctctgc      60
agccggcccg ccgtcggcca gaactgcagc gggccgtgcc ggtgcccgga cgagccggcg      120
ccgcgctgcc cggcgggggt gacccctcgt ctggacgget gcggctgctg ccgcgtctgc      180
gccaagcagc tgggcgagct gtgcaccgag cgcgaccctt gcgaccogca caagggcctc      240
ttctgtgact tcggctcccc ggccaaccgc aagatcggcg tgtgcaccgc caaagatggt      300
gtccctgca tcttcggtgg tacggtgtac cgcagcggag agtccttcca gagcagctgc      360
aagtaccagt gcacgtgcct ggacggggcg gtgggctgca tgccctgtg cagcatggac      420
gttcgtctgc ccagccctga ctgccccttc ccgaggaggg tcaagctgcc cgggaaatgc      480
tgcgaggagt ggggtgtgtga cgagoccaaag gaccaaaccg tgggtgggoc tgccctcgcg      540
gcttaccgac tggaagacac gtttggccca gacccaacta tgattagagc caactgcctg      600
gtccagacca cagagtggag cgcctgttcc aagacctgtg ggatgggcat ctccaccggg      660

gttaccaatg acaacgcctc ctgcaggcta gagaagcaga gccgcctgtg catggtcagg      720
ccttgcaag ctgacctgga agagaacatt aagaagggca aaaagtgcac ccgtactccc      780
aaaatctcca agcctatcaa gtttgagctt tctggctgca ccagcatgaa gacataccga      840
gctaaattct gtggagtatg taccgacggc cgatgctgca cccccacag aaccaccacc      900
ctgccggtgg agttcaagtg ccctgacggc gaggtcatga agaagaacat gatgttcac      960
aagacctgtg cctgccatta caactgtccc ggagacaatg acatctttga atcgctgtac     1020
tacaggaaga tgtacggaga catggcatga                                     1050

```

<210> 14
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 14

5

ES 2 665 851 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro
 130 135 140

Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
 145 150 155 160

Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val Gly

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CTGF humano o un fragmento del anticuerpo anti-CTGF humano que comprende:
- 5 una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante la SEQ ID NO: 10; y
una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante la SEQ ID NO: 4.
- 10 2. El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es una región constante Igy1 humana.
3. El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de cadena ligera del anticuerpo es una región constante Iglk humana.
- 15 4. El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una región constante de cadena pesada del anticuerpo es una región constante Igy1 humana, y una región constante de cadena ligera del anticuerpo es una región constante Iglk humana.
- 20 5. El fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento es un fragmento de región variable de cadena sencilla, Fab, Fab' o F(ab')₂.
6. El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 5, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se fusionan con otro péptido u otra proteína, o está modificado con un agente modificante.
- 25 7. El anticuerpo anti-CTGF humano de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante la SEQ ID NO: 12; y
30 una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante la SEQ ID NO: 8.
8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 35 9. Una célula huésped que se selecciona de entre el grupo que consiste en las siguientes (a) y (b):
- (a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1; y
- 40 (b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 45 10. Una célula huésped que se selecciona de entre el grupo que consiste en las siguientes (a) y (b):
- (a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7; y
- 50 (b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7.
- 55 11. Un método para la producción de un anticuerpo anti-CTGF humano o un fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano, comprendiendo el método expresar un anticuerpo anti-CTGF humano o un fragmento de anticuerpo anti-CTGF humano cultivando la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 9.
- 60 12. Un método para la producción de un anticuerpo anti-CTGF humano, comprendiendo el método expresar un anticuerpo anti-CTGF humano cultivando la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10.
- 65