

一种含抗结缔组织生长因子抗体的药物组合物

技术领域

本披露属于药物制剂领域，具体涉及一种包含抗体的药物组合物，以及其作为药物的用途。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

结缔组织生长因子（CTGF）的表达由转化生长因子 β （TGF β ）超家族的成员诱导。该超家族包括 TGF β -1、-2、和-3、骨形态发生蛋白（BMP）-2 和活化素。许多调节剂包括地塞米松、凝血酶、血管内皮生长因子（VEGF）和血管紧张肽 II；以及环境刺激包括高血糖和高血压也诱导 CTGF 的表达。

TGF β 对 CTGF 表达的刺激是快速且长期的，无需持久施加 TGF β 。TGF β 通过 CTGF 启动子中的 DNA 调控元件进行的转录激活，导致 CTGF 的表达增强。在肾小球性肾炎、IgA 肾病、间灶性和节段性肾小球硬化症和糖尿病性肾病中，CTGF 的表达被上调。在慢性肾小管间质（tubulointerstitial）损伤部位也观察到表达 CTGF 的细胞数增加，并且 CTGF 水平与损伤程度相关。另外，在与肾实质瘢痕化和硬化相关的各种肾病中，CTGF 在肾小球和肾小管间质中的表达也增加。CTGF 的升高水平也与肝纤维化、心肌梗死和肺纤维化相关。例如，在患有自发性肺纤维化（IPF）患者中，在生物活检和支气管肺泡灌洗液细胞中，CTGF 被强烈上调。因此，在如上所述的疾病中，CTGF 是一种有效的治疗靶。

发明内容

本披露提供一种含抗 CTGF 抗体的药物组合物。该组合物具有稳定性好，冻干形态好等优势。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

i) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

ii) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

ii-i) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 69 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 70 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

ii-ii) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 85 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 70 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述的抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

iv) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述的抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

iv-i) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72 和 SEQ ID NO: 73 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75 和 SEQ ID NO: 76 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

iv-ii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103 和 SEQ ID NO: 104 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75 和 SEQ ID NO: 76 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 如前任一项中所述的抗 CTGF 抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述的抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

(v-1) 所述重链可变区, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 6、27、28 或 29 具有至少 90% 的序列同一性, 和所述轻链可变区, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7、22、23、24、25 或 26 具有至少 90% 的序列同一性;

(vi-1) 所述重链可变区, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、33、34、35 或 36 具有至少 90% 的序列同一性, 和所述轻链可变区, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 9、30、31 或 32 具有至少 90% 的序列同一性; 或

(vi-i) 所述重链可变区, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 69、81、82、83、84 或 85 具有至少 90% 的序列同一性, 和所述轻链可变区, 其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 70、77、78、79 或 80 具有至少 90% 的序列同一性。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述的抗 CTGF 抗

体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(v) 所述重链可变区与 SEQ ID NO: 6、27、28 或 29 中所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 7、22、23、24、25 或 26 中所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；或

(vi) 所述重链可变区与 SEQ ID NO: 8、33、34、35 或 36 所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 9、30、31 或 32 所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；或

所述重链可变区与 SEQ ID NO: 6 中所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 7 中所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；

所述重链可变区与 SEQ ID NO: 27、28 或 29 中所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 22、23、24、25 或 26 中所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；

所述重链可变区与 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；

所述重链可变区与 SEQ ID NO: 33、34、35 或 36 所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 30、31 或 32 所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(vi-ii) 所述重链可变区与 SEQ ID NO: 69、81、82、83、84 或 85 中所示的重链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO: 70、77、78、79 或 80 中所示的轻链可变区具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗

体中所述抗 CTGF 抗体为人源化抗体，所述人源化抗体包含人抗体的框架区或其框架区变体，所述框架区变体在人抗体的轻链框架区和/或重链框架区上分别具有至多 10 个的回复突变；

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含如下所述的重链可变区和轻链可变区：

(a) 所述轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，并且包含选自 4L、36F、43S、45K、47W、58V 或 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述重链可变区，其包含序列分别如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且包含选自 28S、30N、49A、75E、76S、93V、94E 或 104D 中的一个或多个氨基酸回复突变；或

(b) 所述轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区中包含选自 36V、44F、46G 或 49G 中的一个或多个回复突变，和/或所述重链可变区，其包含序列分别如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且包含 44G、49G、27F、48L、67L、71K、78V 或 80F 中的一个或多个回复突变。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含如下所述的重链可变区和轻链可变区：

(b-i) 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75 和 SEQ ID NO: 76 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，以及选自 45P、46W、48Y、69S 或 70Y 中的一个或多个回复突变，和重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72 和 SEQ ID NO: 73 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及 27F、38K、48I、67K、68A、70L 或 72F 中的一个或多个回复突变；或

(b-ii) 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75 和 SEQ ID NO: 76 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，且包含选自 45P、46W、48Y、69S 或 70Y 中的一个或多个回复突变，和重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103 和 SEQ ID NO: 104 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且包含 27F、38K、48I、67K、68A、70L 或 72F 中的一个或多个回复突变。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含如下所示的重链可变区和轻链可变区：

(vii) 所述重链可变区序列如 SEQ ID NO: 6 所示和所述轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 7 所示；

(viii) 所述重链可变区序列如 SEQ ID NO: 27、28 或 29 所示和所述轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 22、23、24、25 或 26 所示；

(ix) 所述重链可变区序列如 SEQ ID NO: 8 所示和所述轻链可变区序列如

SEQ ID NO: 9 所示；或

(x) 所述重链可变区序列如 SEQ ID NO: 33、34、35 或 36 所示和所述轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 30、31 或 32 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含如下所示的重链可变区和轻链可变区：

(xi) 所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 70 所示；或

(xii) 所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 81、82、83、84 或 85 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77、78、79 或 80 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含如下表 1、表 2 和表 3 所示的重链可变区和轻链可变区：

表 1：mab147 来源的人源化抗体轻链可变区和重链可变区组合

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

表 2：mab164 人源化抗体轻链可变区和重链可变区组合

	Hu164-VH5 SEQ ID NO: 33	Hu164-VH6 SEQ ID NO: 34	Hu164-VH7 SEQ ID NO: 35	Hu164-VH8 SEQ ID NO: 36
Hu164-VL7 SEQ ID NO: 30	Hu164-57	Hu164-67	Hu164-77	Hu164-87
Hu164-VL8 SEQ ID NO: 31	Hu164-58	Hu164-68	Hu164-78	Hu164-88
Hu164-VL9 SEQ ID NO: 32	Hu164-59	Hu164-69	Hu164-79	Hu164-89

表 3：mab95 人源化抗体轻链可变区和重链可变区组合

	Hu95-VH1 SEQ ID NO: 81	Hu95-VH2 SEQ ID NO: 82	Hu95-VH3 SEQ ID NO: 83	Hu95-VH4 SEQ ID NO: 84	Hu95-VH5 SEQ ID NO: 85
--	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------

Hu95-VL1 SEQ ID NO: 77	Hu95-11	Hu95-21	Hu95-31	Hu95-41	Hu95-51
Hu95-VL2 SEQ ID NO: 78	Hu95-12	Hu95-22	Hu95-32	Hu95-42	Hu95-52
Hu95-VL3 SEQ ID NO: 79	Hu95-13	Hu95-23	Hu95-33	Hu95-43	Hu95-53
Hu95-VL4 SEQ ID NO: 80	Hu95-14	Hu95-24	Hu95-34	Hu95-44	Hu95-54

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含如下所示的重链可变区和轻链可变区：

(xiii) 所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；

(xiv) 所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示；或

(xv) 所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 85 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体中所述抗体进一步包含抗体重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体；更优选地，所述抗体包含序列如 SEQ ID NO: 37 或 38 所示的重链恒定区和序列如 SEQ ID NO: 39 或 40 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含：

(c) 与序列如 SEQ ID NO: 41、43、44、45、46、47 或 48 所示的重链具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的重链和与序列如 SEQ ID NO: 42、49、50、51、52 或 53 所示的轻链具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的轻链；

(d) 与序列如 SEQ ID NO: 54、56、57、58、59、60、61、62 或 63 所示的重链具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的重链和与序列如 SEQ ID NO: 55、64、65 或 66 所示的轻链具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 的同一性的轻链；

(e) 序列如 SEQ ID NO: 41、43、44、45、46、47 或 48 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 42、49、50、51、52 或 53 所示的轻链；或

(f) 序列如 SEQ ID NO: 54、56、57、58、59、60、61、62 或 63 所示的重链

和序列如 SEQ ID NO: 55、64、65 或 66 所示的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含：

(g) 与 SEQ ID NO: 86、88、89、90、91、92、93、94、95、96 或 97 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的重链，和与 SEQ ID NO: 87、98、99、100 或 101 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的轻链；或

(h) 如 SEQ ID NO: 86、88、89、90、91、92、93、94、95、96 或 97 所示的重链和如 SEQ ID NO: 87、98、99、100 或 101 所示的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述的抗 CTGF 抗体包含：

(j) 如 SEQ ID NO: 46 所示的重链和如 SEQ ID NO: 49 所示的轻链；

(k) 如 SEQ ID NO: 61 所示的重链和如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链；或

(l) 如 SEQ ID NO: 97 所示的重链和如 SEQ ID NO: 98 所示的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物中还包含缓冲剂。在一些实施方案中，所述的缓冲剂是组氨酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂、枸橼酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂或磷酸盐缓冲剂。在一些实施方案中，所述的缓冲剂是组氨酸-盐酸盐缓冲剂或组氨酸-醋酸盐缓冲剂。在一些实施方案中，所述的缓冲剂是组氨酸-盐酸盐缓冲剂。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为约 5.0-约 6.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.0-约 6.0。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4、约 5.5、约 5.6、约 5.7、约 5.8、约 5.9、约 6.0、约 6.1、约 6.2、约 6.3、约 6.4 或约 5.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0-6.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0-6.0。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.5-5.7。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5，或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 CTGF 抗体的浓度为约 100 mg/mL 至约 200 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 CTGF 抗体的浓度为约 150 mg/mL 至约 200 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 CTGF 抗体的浓度为约 100 mg/mL、约 110 mg/mL、约 120 mg/mL、约 130 mg/mL、约 140 mg/mL、约 150 mg/mL、约 160 mg/mL、约 170 mg/mL、约 180 mg/mL、约 190 mg/mL 或约 200 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 CTGF 抗体的浓度为 100 mg/mL 至 200 mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 CTGF 抗体的浓度为 150 mg/mL 至 200

mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 CTGF 抗体的浓度为 100 mg/mL、110 mg/mL、120 mg/mL、130 mg/mL、140 mg/mL、150 mg/mL、160 mg/mL、170 mg/mL、180 mg/mL、190 mg/mL 或 200 mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂是非离子表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自聚山梨酯、聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80、聚山梨酯 20 或泊洛沙姆 188。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂浓度为约 0.05 mg/mL 至约 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为约 0.2 mg/mL 至约 0.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为约 0.05 mg/mL、约 0.1 mg/mL、约 0.2 mg/mL、约 0.3 mg/mL、约 0.4 mg/mL、约 0.5 mg/mL、约 0.6 mg/mL、约 0.7 mg/mL、约 0.8 mg/mL、约 0.9 mg/mL 或约 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL 至 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL 或 1.0 mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含糖。在一些实施方案中，所述糖选自常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物，包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等。所述的糖可选自葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，sylitol，山梨糖醇，甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，山梨醇，麦芽糖醇，乳糖醇，异-麦芽酮糖等。在一些实施方案中，所述糖选自蔗糖、甘露醇和海藻糖中的一种或多种。在一些实施方案中，所述糖为蔗糖。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述糖的浓度为约 20 mg/mL 至约 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为约 40 mg/mL 至

约 80 mg/mL。在一些实施方案中,所述糖的浓度为约 60 mg/mL 至约 80 mg/mL。在一些实施方案中,所述糖的浓度为约 20 mg/mL、约 30 mg/mL、约 40 mg/mL、约 50 mg/mL、约 60 mg/mL、约 70 mg/mL、约 80 mg/mL、约 90 mg/mL 或约 100 mg/mL。在一些实施方案中,所述糖的浓度为 20 mg/mL 至 100 mg/mL。在一些实施方案中,所述糖的浓度为 40 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中,所述糖的浓度为 60 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中,所述糖的浓度为 20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL 或 100 mg/mL,或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的浓度为约 5 mM 至约 100 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为约 30 mM 至约 70 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为约 5 mM、约 10 mM、约 20 mM、约 30 mM、约 40 mM、约 50 mM、约 60 mM、约 70 mM、约 80 mM、约 90 mM 或约 100 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 30 mM 至 70 mM。在一些实施方案中,所述缓冲剂的浓度为 5 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM 或 100 mM,或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含额外的稳定剂。在一些实施方案中,所述额外的稳定剂是任选的盐、糖醇、表面活性剂、聚醚类、氨基酸或螯合剂等。在一些实施方案中,所述额外的稳定剂选自 PEG (聚乙二醇)、精氨酸和 EDTA。在一些实施方案中,所述 PEG 是 PEG 3350 或 PEG 4000。在一些实施方案中,所述 PEG 的浓度为 10 mg/mL 至 50 mg/mL。在一些实施方案中,所述 PEG 的浓度为 10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL 或 50 mg/mL。在一些实施方案中,所述精氨酸的浓度为 10 mM 至 100 mM。在一些实施方案中,所述精氨酸的浓度为 10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM 或 100 mM。在一些实施方案中,所述 EDTA 的浓度为 0.5 mM 至 10 mM。在一些实施方案中,所述 EDTA 的浓度为 0.5 mM、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM 或 10 mM,或者为这些点值之间的任意范围。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其包含如下组分:

(a) 约 100 mg/mL 至约 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体, (b) 约 0.05 mg/mL 至约 1 mg/mL 的表面活性剂, (c) 约 20 mg/mL 至约 100 mg/mL 的糖, 和 (d) 约 5 mM 至约 100 mM 的组氨酸盐缓冲剂; 所述药物组合物的 pH 为约 5.0 至约 6.5。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其包含如下组分:

(a) 约 150 mg/mL 至约 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体, (b) 约 0.2 mg/mL 至约 0.6 mg/mL 的聚山梨酯, (c) 约 40 mg/mL 至约 80 mg/mL 的糖, 和 (d) 约 30 mM 至约 70 mM 的组氨酸盐缓冲剂; 所述药物组合物的 pH 为约 5.0-约 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 约 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 约 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 约 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5 至约 5.7。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 约 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 约 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 约 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 5.7。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的醋酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-醋酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的琥珀酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的柠檬酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5-6.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.5、6.0 或 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的磷酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 6.0-6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体、(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 20，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，(d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂和 (e) 2% PEG 3350；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，(d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂和 (e) 50 mM 精氨酸；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，(d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂和 (e) 1% 甘露醇；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的蔗糖，(d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂和 (e) 0.5-10 mM EDTA；所述药物组合物的 pH 为 5.5。在一些实施方案中，所述 EDTA 的浓度为 0.5 mM、5 mM、10 mM。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70 mg/mL 的海藻糖和 (d) 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述药物组合物是液体制剂。在一些实施方案中，所述液体制剂的溶剂是水。

本披露还提供一种的冻干制剂，其特征在于所述冻干制剂复溶后可形成如上任一项所述的药物组合物。

本披露还提供一种制备冻干制剂的方法，其中包括将如上任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

本披露还提供一种冻干制剂，所述制剂通过将如上任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。在一些实施方案中，如上任一项所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。在一些实施方案中，该冻干制剂于 40℃ 稳定至少 7 天，至少 14 天或至少 28 天。

本披露还提供一种复溶溶液，其特征在于所述复溶溶液是通过将如上任一项所述的冻干制剂经复溶制备获得，任选地，所述复溶溶液通过将如上任一项所述的冻干制剂在生理上可接受的溶剂中复溶获得，所述生理上可接受的溶剂包括但不限于注射用水、生理盐水、缓冲剂。

在一些实施方案中，如上所述的复溶溶液包含：

(a) 约 150 mg/mL 至约 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.2 mg/mL 至约 0.6 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 约 40 mg/mL 至约 80 mg/mL 的糖，和 (d) 约 30 mM 至约 70 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.0 至约 6.0。

在一些实施方案中，如上所述的复溶溶液包含：

(a) 约 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 约 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 约 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5 至约 5.7。

在一些实施方案中，如上所述的复溶溶液包含：

(a) 约 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 约 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 约 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液，其为静脉注

射制剂、皮下注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂；在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液，其为静脉注射制剂。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液，其适于静脉注射、皮下注射、腹腔注射或肌肉注射。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液或冻干制剂，其用于制备静脉注射、皮下注射、腹腔注射或肌肉注射的药物。

本披露还提供一种制品，其包括容器，该容器中装有如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂或如上任一项所述的复溶溶液。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品在制备治疗 CTGF 相关的疾病的药物中的用途。

本披露还提供一种治疗或预防与 CTGF 相关的疾病的方法，包括给予患者有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品，其用于治疗 CTGF 相关的疾病。

在一些实施方案中，所述与 CTGF 相关的疾病为纤维性疾病、高血压、糖尿病、心肌梗死、关节炎、CTGF 相关细胞增殖性疾病、动脉粥样硬化、青光眼或癌症。在一些实施方案中，所述纤维性疾病选自：自发性肺纤维化、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病骨关节炎、硬皮病、慢性心力衰竭、肝硬化或肾纤维化。在一些实施方案中，所述癌症选自：急性淋巴母细胞性白血病、皮肤纤维瘤、乳腺癌、血管脂肪瘤、血管平滑肌瘤、结缔组织生成性癌症、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃肠道癌症或肝癌。

附图说明

图 1：通过 ELISA 检测，源自 mab164 的人源化抗体与人 CTGF 的亲合力。

图 2：源自 mab147 或源自 mab164 的人源化抗体对 SU86.86 小鼠移植瘤的抑制实验结果。

具体实施方式

术语

为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

结缔组织生长因子（Connective Tissue Growth Factor, CTGF）是一种最初分离自人脐静脉内皮细胞的 36kD 富含半胱氨酸的肝素结合分泌糖蛋白。CTGF 属于蛋白质 CCN（CTGF, Cyr61, Nov）家族（分泌糖蛋白），该家族包括血清诱导的立即早期基因产物 Cyr61、推断的癌基因 Nov、ECM 相关蛋白 FISP-12、src 诱导的基因 CEF-10、Wnt 诱导的分泌蛋白 WISP-3 以及抗增殖蛋白 HICP/rCOP。CCN 蛋白的特征在于保守的 38 个半胱氨酸残基，该 38 个半胱氨酸残基占总氨基酸含量 10% 以上并且形成具有 N-末端和 C-末端结构域模块结构(modular structure)。CTGF 模块结构包括在 N-末端结构域的针对胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF-BP)和 von Willebrand 因子(VWC)的保守基序，以及在 C-末端结构域的血小板反应蛋白(TSP1)和半胱氨酸基序。本披露的 CTGF 包含任意来源的野生型蛋白或保留其功能的变体。

本披露的术语“抗体”以最广义使用，其涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体或其抗原结合片段（也称“抗原结合部分”），鼠源抗体，嵌合抗体或人源化抗体，亲和力和成熟的抗体，只要它们展现出期望的抗原结合活性。天然抗体指天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区（VH），又称作可变重域或重链可变域，接着是三个恒定域（CH1、CH2 和 CH3）。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区（VL），又称作可变轻域，或轻链可变域，接着是一个恒定轻（CL）域。“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文可互换使用，指具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有含有如本文所限定的 Fc 区的重链的抗体。在一些实施方案中，本披露的全长抗体包括由表 1、表 2 和表 3 中轻重链可变区组合中的轻链可变区与轻链恒定区连接和重链可变区与重链恒定区连接后所形成的全长抗体。本领域技术人员可以根据实际需要选择不同的抗体来源的轻链恒定区、重链恒定区，例如人抗体来源的轻链恒定区和重链恒定区。

“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中涉及抗体结合抗原的域。VH 和 VL 各包含四个保守的框架区（FR）和三个互补决定区（CDR）。其中，术语“互补决定区”、“CDR”指可变结构域内主要促成抗原结合的区域；“框架”或“FR”是指除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2、和 LCDR3。每个 VH 和 VL 由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。单个 VH 或 VL 可能足以赋予抗原结合特异性。

可以采用各种公知的方案来确定 CDR 的氨基酸序列边界，例如：“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991、“Chothia”编号规则、“AbM”编号规则、“contact”编号规则（参见 Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001）和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则（参见 Lefranc M.P., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)）等。包括例如 Kabat 编号和 IMGT 编号系统等在内的编号系统之间的关系是本领域技术人员熟知的，并且如下表 4 中所示。

表 4. CDR 编号系统之间的关系

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

抗体的“类”指其重链拥有的恒定区的类型。根据其恒定区氨基酸序列，抗体轻链包括两种类型，卡帕（ κ ）和拉姆达（ λ ）。根据抗体重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，可将抗体分为五类，或称为抗体同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。本披露中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体，示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 重链恒定区变体。在一些实施方案中，所述替换是 YTE 突变（M252Y/S254T/T256E），L234A 和/或 L235A 突变，S228P 突变，和/或获得杵臼（knob-into-hole）结构的突变。这些突变已被证实使得抗体具有新的性能，但不改变抗体可变区的功能。在一些实施方案中，抗体是 IgG₁ 同种型的，具有铰链区中的 P329、P234 和 P235 突变以降低效应子功能。在一些实施方案中，抗体是 IgG₂ 同种型。在一些实施方案中，抗体是 IgG₄ 同种型的，具有铰链区中的 S228P 突变以改善 IgG₄ 抗体的稳定性。

“抗体片段”指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分与完整抗体所结合的抗原相结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)₂、单域抗体、双抗体、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv）；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。抗体重链的 Fc 区的边界还可

以变化，例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 447）或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 446 和 447）。因此，在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括去除了所有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括没有去除 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适天然序列 Fc 区包括人 IgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3 和 IgG4。除非本文中另有规定，Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统，又称作 EU 索引，如记载于 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991。

“鼠源抗体”在本披露中为根据本领域知识和技能制备的针对人 CTGF 的来源与鼠的单克隆抗体。制备时用 CTGF 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本披露一个优选的实施方案中，所述的鼠源抗 CTGF 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本披露一个优选的实施方案中，所述嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的 CTGF 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变（例如 L234A 和/或 L235A 突变，和/或 S228P 突变）的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持或增强活性。本披露的人源化抗体也包括进一步由酵母菌展示对 CDR 进行亲和力成熟突变后的人源化抗体。

“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本文所用，“结合亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成员之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常可以由解离常数（KD）表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法（包括本文所述的那些）测量。下面描述了用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施例。

“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，而如本文所使用的术语“kdis”或“kd”意在是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所使用的，术语“KD”指解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka ）并且表示为摩尔浓度（M）。可以使用本领域公知的方法测定抗体的 KD 值。用于测定抗体 KD 的方法包括使用生物传感系统例如系统测量表面等离子体共振，或通过溶液平衡滴定法（SET）测量溶液中的亲和力。

“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。优选的在一些实施方式中，亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。

“氨基酸突变”涵盖氨基酸替代，缺失，插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体拥有期望的特性。氨基酸序列缺失和插入包括氨基和/或羧基端缺失和氨基酸插入。具体的氨基酸突变可以是氨基酸替代。在一个实施方式中，氨基酸突变是非保守性的氨基酸替代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸替代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种天然氨基酸的衍生物（例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸）替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR，基因合成等。预计基因工程以外的改变氨基酸侧链基团的方法，如化学修饰也可能是可用的。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。

“约”是指处于如本领域的普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围之内，其将部分取决于所述值是如何测量或测定的，即所述测量系统的限制。在特定测定、结果或实施方案的上下文中，除非实施例或说明书其它地方内另有明确说明，否则“约”意指给定数值 $\pm 5\%$ 以内的范围。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸盐缓冲剂”是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸盐，组氨酸-醋酸盐，组氨酸-磷酸盐，组氨酸-硫酸盐等缓冲剂，

优选组氨酸-盐酸盐缓冲剂或组氨酸-醋酸盐缓冲剂，组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋酸配制而成，组氨酸-盐酸盐缓冲剂是组氨酸与组氨酸盐酸盐配制而成，或组氨酸与盐酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠。示例性的，所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成，或由琥珀酸与琥珀酸钠配制而成。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“稳定剂”是指有助于维持生物制药药物的结构完整性的组分，特别是在冷冻和/或冻干和/或储存期间（特别是当暴露于应激（stress）时）。这种稳定作用可以由于多种原因而产生，通常这种稳定剂可起到减轻蛋白质变性的渗透剂的作用。本文中额外的稳定剂是指除了缓冲体系、表面活性剂和糖醇以外的稳定剂，例如选自 PEG、精氨酸和 EDTA 的稳定剂。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是保持活性成分的稳定性，促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

本披露中，“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

本披露中所述药物组合物的溶液形式，若无特殊说明，其中的溶剂均为水。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

尽管本披露提供了含量范围或含量值，但本领域一般技术人员理解，所述含量范围或含量值涵盖了所测定具体值的可接受误差范围。

本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度（2-8℃）

保存至少 3 个月、优选 6 个月、更优选 1 年，且甚至更优选地多达 2 年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括 25℃ 的温度保存包括 1 个月、3 个月、6 个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子：通过 SEC-HPLC 测得，通常不超过约 10%、优选不超过约 5% 的抗体单体发生聚集或降解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色澄明液体，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10% 变化。通常观察到不超过约 10%、优选不超过约 5% 的减少。通常形成不超过约 10%、优选不超过约 5% 的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确定蛋白二级结构）来评价。

如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短（通过诸如尺寸排阻色谱法和 CE-SDS 等方法来评价）、氧化（通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价）、脱酰胺作用（通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价）和异构化（通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价）。

如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。

“施用”、“给予”和“处理”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本披露的任一种的药物组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而己知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的

能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

本披露中与 CTGF 相关的疾病没有限制，只要它是与 CTGF 相关的疾病即可，例如利用本披露的分子诱导的治疗反应可通过结合人类 CTGF，然后阻遏 CTGF 与其受体/配体的结合，或杀伤过表达 CTGF 的肿瘤细胞。因此，当处于适于治疗应用的制备物和制剂中时，本披露的分子对这样一些人是非常有用的，他们患有肿瘤或癌症，可选地包括肺纤维化、肾纤维化、肿瘤形成和生长、青光眼、细胞增殖性疾病、白内障、脉络膜新血管形成、视网膜剥脱、增生性玻璃体视网膜病变、黄斑变性、糖尿病性视网膜病、角膜瘢痕形成和角膜浑浊、囊肿、减少血管钙化、胰腺导管腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、放射性纤维化（radiation-induced fibrosis (RIF)）、特发性肺纤维化、肺重塑疾病选自集团构成的哮喘、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、囊性纤维化、肺气肿等，优选胰腺癌、肺纤维化、肾纤维化。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

实施例

以下结合实施例进一步描述本披露，但这些实施例并非是对本披露范围的限制。本披露实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如参照冷泉港实验室出版的《抗体技术实验手册》，《分子克隆手册》；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

一、抗体

实施例 1-1. CTGF 抗原、抗体的制备

一、抗原的设计及表达

以人 CTGF 蛋白 (Genbank 编号: NM_001901.2) 作为模板, 设计抗原及检测用蛋白的氨基酸序列, 可选的在 CTGF 蛋白或者片段上融合不同的标签, 分别克隆到 pTT5 载体上或 pXC 载体上, 在 293 细胞瞬转表达或 LONZA CHO 细胞稳定表达, 获得编码本披露抗原及检测用蛋白。以下 CTGF 抗原未特殊说明的均指人 CTGF。

人 CTGF 全长蛋白 (用于免疫), SEQ ID NO: 1)

QNCSGPCRCPPDEPAPRCPAGVSLVLDGCGCCRVCAKQLGELCTERDPCDP
HKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGA
VGCMP LCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLP GKCC EEWVCDEPKDQTVVGPALAA
YRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQSRL
CMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDG
RCCTPHRTTTLPVEFKCPDGEVMKKNNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYRK
MYGDMA

CTGF-his (人 CTGF 成熟蛋白与 his 标签的融合蛋白), 可用于检测, SEQ ID NO: 2

MEFGLSWLFLVAILKGVQC*QNCSGPCRCPPDEPAPRCPAGVSLVLDGCGCCRVCAKQLGELCTERDPCDP*HKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCIFGGTVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGA*VGCMP LCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLP GKCC EEWVCDEPKDQTVVGPALAA*YRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNASCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCGVCTDGRCCTPHRTTTLPVEFKCPDGEVMKKNNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYRKMYGDMAHHHHHH

(备注: 单下划线为信号肽, 斜体为人 CTGF 编码区, 双下划线为 his 标签。)

mCTGF-mFc (小鼠 CTGF 编码区与小鼠 Fc 标签的融合蛋白), 可用于检测, SEQ ID NO: 3

MEFGLSWLFLVAILKGVQC*QDCSAQCQCAAEAPHCPAGVSLVLDGCGCCRVCAKQLGELCTERDPCDP*HKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCVFGGSVYRSGESFQSSCKYQCTCLDGA*VGCMP LCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLP GKCC EEWVCDEPKDRTAVGPALAA*YRLEDTFGPDPTMMRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDNTFCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKIAKPVKFELSGCTSVKTYRAKFCGVCTDGRCCTPHRTTTLPVEFKCPDGEIMKKNNMMFIKTCACHYNCPGDNDIFESLYRKMYGDMAEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(备注: 单下划线为信号肽, 斜体为小鼠 CTGF 编码区, 双下划线为 mFc 标签。)

小鼠 CTGF 蛋白-His 标签, SEQ ID NO: 4

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQDCSAQCQCAAEAPHCPAGVSLVLDGCGCCR
VCAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCVFGGSVYRSG
ESFQSSCKYQCTCLDGAVGCVPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCDE
PKDRTAVGPALAAAYRLEDTFGPDPTMMRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTND
NTFCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKIAKPVKFELSGCTSVKTYRAK
FCGVCTDGRCTPHRTTTL PVEFKCPDGEIMKKNMFFIKTCACHYNCPGDNDIFE
SLYYRKMVGDMAHHHHHH

(备注：单下划线为信号肽，斜体为小鼠 CTGF 编码区，双下划线为 his 标签。)

食蟹猴 CTGF-Fc (食蟹猴 CTGF 编码区与 Fc 的融合蛋白)，可用于检测，SEQ ID NO: 5

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQNCSGPCRCPAEQAPRCPAGVSLVLDGCGCCR
VCAKQLGELCTERDPCDPHKGLFCDFGSPANRKIGVCTAKDGAPCIFGGTVYRSGE
SFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLPGKCCEEWVCDEP
KDQTVVGPALAAAYRLEDTFGPDPTMIRANCLVQTTEWSACSKTCGMGISTRVTNDN
ASCRLEKQSRLCMVRPCEADLEENIKKGKKCIRTPKISKPIKFELSGCTSVKTYRAKF
CGVCTDGRCTPHRTTTL PVEFKCPDGEVMKKNMFFIKTCACHYNCPGDNDIFES
LYYRKMVGDMAEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(备注：单下划线为信号肽，斜体食蟹猴 CTGF 编码区，双下划线为 Fc 标签。)

二、CTGF 相关重组蛋白的纯化，以及抗人 CTGF 杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

1. ProteinG 亲和层析分离纯化杂交瘤上清

对于小鼠杂交瘤上清纯化，首选 ProteinG 进行亲和层析，将培养所得杂交瘤离心取上清，根据上清体积加入 10-15% 体积的 1M Tris-HCl (pH8.0-8.5) 调节上清 pH 至中性。利用 6M 盐酸胍，将 ProteinG 柱洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱体积；利用如 1×PBS (pH7.4) 对层析柱平衡 3-5 倍柱体积；细胞上清利用低流速上样结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间；利用 1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线；利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0) 缓冲液进行样品洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节洗脱产物的 pH 至 5-6。可以利用本领域技术人员熟知的方法，对洗脱产物进行溶液置换，如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系，或者利用分子排阻如 G-25 脱盐替换成所需的缓冲体系，或者利用如 Superdex 200 等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。

2. Protein A 亲和层析纯化抗体

首先将表达抗体的细胞培养上清进行高速离心收取上清。利用 6M 盐酸胍将

ProteinA 亲和柱洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱体积。利用如 1×PBS (pH 7.4) 对层析柱平衡 3-5 倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间，结合完毕后利用 1×PBS (pH 7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0-3.5) 缓冲液进行样品洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH 8.0) 快速调节洗脱产物的 pH 至 5-6。可以利用本领域技术人员熟知的方法，对洗脱产物进行溶液置换，如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系，或者利用分子排阻如 G-25 脱盐替换成所需的缓冲体系，或者利用如 Superdex 200 等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。

3. 镍柱纯化人 CTGF-his 等 CTGF 相关重组蛋白

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质，并将缓冲液置换为 PBS，加入咪唑至终浓度为 5mM。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液平衡镍柱，冲洗 2-5 倍柱体积。将置换后的上清样品上柱结合，介质可以选择不同公司的镍柱。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。后用 PBS+10mM 咪唑冲洗层析柱，除去非特异结合的杂蛋白，并收集流出液。再用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液洗脱目的蛋白，并收集洗脱峰。

收集的洗脱产物浓缩后可用凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，流动相为 PBS，去除聚体及杂蛋白峰，收集目的产物洗脱峰。所得到的蛋白经电泳，肽图，LC-MS 鉴定为正确后分装备用。

4. Protein A 亲和层析纯化人 CTGF-Fc，食蟹猴 CTGF-Fc 等 CTGF 相关重组蛋白

首先将培养上清进行高速离心收取上清。利用 6M 盐酸胍将 ProteinA 亲和柱洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱体积。利用如 1×PBS (pH 7.4) 对层析柱平衡 3-5 倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间，结合完毕后利用 1×PBS (pH 7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0-3.5) 缓冲液进行样品洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰。

收集的洗脱产物浓缩后可用凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，流动相为 PBS，去除聚体及杂蛋白峰，收集目的产物洗脱峰。所得到的蛋白经电泳，肽图，LC-MS 鉴定为正确后分装备用。

实施例 1-2. 抗人 CTGF 单克隆抗体的制备

一、免疫

抗人 CTGF 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 SJL 白小鼠，雌性，6-8 周龄（北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK（京）2012-0001）。饲养环境：SPF 级。小鼠购进后，实验室环境饲养 1 周，12/12 小时

光/暗周期调节, 温度 20-25℃; 湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为 CTGF (R&D) 和 mCTGF-mFc。

免疫方案: 用 CTGF 蛋白进行小鼠免疫, 25 微克/只/次, 腹腔内注射。第 0 天腹膜内 (IP) 注射 100 μ L/只, 之后每 14 天进行一次加强免疫。于第 21、35、49、63 天取血, 用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在 7-9 次免疫以后, 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天加强免疫, 腹膜内 (IP) 注射 25 μ g/只的生理盐水配制的 CTGF 蛋白抗原溶液。

二、脾细胞融合

采用 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞以 $0.5-1 \times 10^6$ /mL 的密度用完全培养基 (含 20% FBS、1 $\times$ HAT、1 $\times$ OPI 的 IMDM 培养基) 重悬, 100 μ L/孔接种于 96 孔板中, 37℃, 5%CO₂ 孵育 3-4 天后, 补充 HAT 完全培养基 100 μ L/孔, 继续培养 3-4 天至形成针尖般克隆。去除上清, 加入 200 μ L/孔的 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1 $\times$ HT 和 1 $\times$ OPI 的 IMDM 培养基), 37℃, 5%CO₂ 培养 3 天后进行 ELISA 检测。

三、杂交瘤细胞的筛选

根据杂交瘤细胞生长密度, 用结合 ELISA 方法进行杂交瘤培养上清检测。并将结合 ELISA 检测的阳性孔细胞上清与猴 CTGF/小鼠 CTGF/人 CTGF 蛋白结合实验 (具体方法实施例 3 相同)。对蛋白 ELISA 结合实验为阳性的孔细胞及时进行扩增冻存保种及 2 到 3 次亚克隆直至获得单细胞克隆。

每次亚克隆细胞也均需进行 CTGF 结合 ELISA。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆, 用无血清细胞培养法进一步制备抗体, 按纯化实例纯化抗体, 供在检测例中使用。

四、杂交瘤阳性克隆序列测定

从阳性杂交瘤中克隆序列的过程如下。收集对数生长期的杂交瘤细胞, 用 Trizol (Invitrogen, Cat No. 15596-018) 按照试剂盒说明书步骤提取 RNA, 用 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 试剂盒反转录 (Takara, Cat No. 2680A)。将反转录得到的 cDNA 采用 mouse Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503) 进行 PCR 扩增后, 将扩增产物送测序公司测序。经测序得到鼠源抗 CTGF 抗体: mab147、mab164、mab95 的可变区氨基酸序列如下:

mab147 VH 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示,

EVQLVESGGGLVQPEGSLKLSAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRT
KSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSESMYLYLQMNNLKTEDTAMYYCVETGFAYWDQGT
LVTVSA

mab147 VL 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示,

QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTNLASG

VPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK

mab164 VH 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示,

QVQLKQSGPGLVQPSQSLCTCTVSGFSLTTFGVHWIRQSPGKGLEWLGVIWRR
GGTDYNAAFMSRLSITKDNSRSHVFFKMTSLQTDDSAIYYCARDGGFDYWGQGTTLT
 VSS

mab164 VL 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示,

QAVVTQESALTTSPGGTVILTCRSSIGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTSN
RAPGVPVRFSGSLIGDKAALTITGAQAEDDAMYFCALWYSTHYVFGGGTKVTVL

mab95 VH 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 69 所示,

EVLLQQSGPVLVKPGPSVKISCKASGFTFTNYDIHWVKQSHGKSLEWIGLVYPY
NGGTAYNQKFKDKATLTFTDSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARWGLIPGTTSYFDVW
 GTGTTTVTVSS

mab95 VL 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 70 所示,

QIVLSQSPPIALSAPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQQKPRSSPKPWYATSNLASG
VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPWTFGGGTRLEIK

上述 mab147、mab164、mab95 抗体可变区序列中, 斜体为 FR 序列, 下划线斜体为 CDR 序列, 序列顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

表 5. 抗 CTGF 抗体重链及轻链 CDR 区氨基酸序列表*

抗体	重链		轻链	
mab147	HCDR1	TYAMN SEQ ID NO: 10	LCDR1	SASSSVSYMH SEQ ID NO: 13
	HCDR2	RIRTKSNYATYYAD SVKD SEQ ID NO: 11	LCDR2	STSNLAS SEQ ID NO: 14
	HCDR3	TGFAY SEQ ID NO: 12	LCDR3	QQRSSYPLT SEQ ID NO: 15
mab164	HCDR1	TFGVH SEQ ID NO: 16	LCDR1	RSSIGAVTTSNYAN SEQ ID NO: 19
	HCDR2	VIWRRGGTDYNAAF MS SEQ ID NO: 17	LCDR2	GTSNRAP SEQ ID NO: 20
	HCDR3	DGGFDY SEQ ID NO: 18	LCDR3	ALWYSTHYV SEQ ID NO: 21
mab95	HCDR1	NYDIH SEQ ID NO: 71	LCDR1	RASSSVSYIH SEQ ID NO: 74
	HCDR2	LVYPYNGGTAYNQK FKD SEQ ID NO: 72	LCDR2	ATSNLAS SEQ ID NO: 75
	HCDR3	WGLIPGTTSYFDV SEQ ID NO: 73	LCDR3	QQWNSNPWT SEQ ID NO: 76

*表格中 CDR 由 Kabat 编号规则确定。

五、人 IgG1 嵌合抗体制备

mab147、mab164、mab95 候选分子经过扩增测序可得到可变区编码基因序列, 以测序所得序列设计首尾引物, 以测序基因为模板, 经过 PCR 搭建各抗体 VH/VK

基因片段，再与表达载体 pHr（带信号肽及 hIgG1/hkappa/hlambda 恒定区基因（CH1-Fc/CL）片段）进行同源重组，构建重组嵌合抗体的全长表达质粒 VH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHr，形成 Ch147, Ch164, Ch95 三个嵌合抗体。

六、鼠源抗人 CTGF 抗体的人源化

通过比对 IMGT (<http://imgt.cines.fr>) 人类抗体重链可变区种系基因数据库和 MOE (Molecular Operating Environment, 分子操作环境) 软件，分别挑选与鼠源抗体同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板，将鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。

1. mab147 的人源化改造

鼠源抗体 mab147 的人源化轻链模板为 IGKV3-11*01 和 IGKJ2*01 或 IGKV1-39*01 和 IGKJ2*01，人源化重链模板为 IGHV3-72*01 和 IGHJ1*01，将鼠源抗体 mab147 的 CDR 分别移植到其人源模板中，进而，对人源化抗体的 FR 部分氨基酸进行回复突变改造，其中轻链可变区回复突变包括 4L、36F、43S、45K、47W、58V 或 71Y 中的一个或多个，重链可变区回复突变包括 28S、30N、49A、75E、76S、93V、94E 或 104D 中的一个或多个（轻链可变区和重链可变区中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定），得到具有不同序列的轻链可变区和重链可变区。即获得含有 mab147 的 CDR 的人源化抗体，其可变区序列如下：

mAb147 人源化抗体可变区具体序列如下：

Hu147-VL1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示：

*EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPRLLIYSTSNLASGI
PARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIK*

Hu147-VL2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示：

*EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPKLLIYSTSNLASGI
PARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIK*

Hu147-VL3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示：

*EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQSPKLWIYSTSNLASG
VPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIK*

Hu147-VL4 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示：

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLLIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIK*

Hu147-VL5 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示：

*DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLWIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKLEIK*

Hu147-VH1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示：

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRT
KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT
LVTVSS*

Hu147-VH2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRT
KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT
 LVTVSS

Hu147-VH3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRT
KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGFAYWDQGT
 LVTVSS。

注: 下划线为以 Kabat 规则定义的 CDR 序列, 顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3- CDR3-FR4。

2. mab164 的人源化改造

鼠源抗体 mab164 的人源化轻链模板分别由 IGLV7-43*01 和 IGLJ2*01、IGLV8-61*01 和 IGLJ2*01, 或 IGLV1-40*02 和 IGLJ2*01 构成, 人源化重链模板分别由 IGHV2-26*01 和 IGHJ6*01, 或 IGHV4-31*02 和 IGHJ6*01 构成, 将鼠源抗体 mab164 的 CDR 分别移植到其人源模板中, 进而, 对人源化抗体的 FR 部分氨基酸进行回复突变改造, 其中轻链可变区回复突变包括 36V、44F、46G 或 49G 中的一个或多个, 重链可变区回复突变包括 44G、49G、27F、48L、67L、71K、78V 或 80F 中的一个或多个(其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定), 即获得 mab164 的人源化抗体重链, 人源化抗体轻链, 其可变区序列如下:

mAb164 人源化抗体可变区具体序列如下:

Hu164-VL7 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示:

ETVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQKPGQAIFRGLIGGTSN
RAPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSTHYVFGGGTKLTVL

Hu164-VL8 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示:

ETVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQTPGQAIFRGLIGGTSN
RAPGVDPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSTHYVFGGGTKLTVL

Hu164-VL9 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示:

ESVVTQPPSVSGAPGQRVTISCRSSIGAVTTSNYANWVQQLPGTAFKGLIGGTSN
RAPGVDPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDADYYCALWYSTHYVFGGGTKLTVL

Hu164-VH5 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示:

EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKALEWLAVIWR
GGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARDGGGFDYWGQGT
 TVSS

Hu164-VH6 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示:

EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKGLEWLGIWRR
GGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVVFMTNMDPVDATYYCARDGGGFDYWGQGT
 TVSS

Hu164-VH7 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示:

EVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWIGVIWRR
GGTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGGGFDYWGQGTTVT
 VSS

Hu164-VH8 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示:

EVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWLGVIWRR
GGTDYNAAFMSRLTISKDTSKNQVSFKLSSVTAADTAVYYCARDGGGFDYWGQGTTVT
 VSS。

注: 上述 Hu164 抗体序列中, 下划线为 CDR 序列, 顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2- FR3-CDR3-FR4, 其中的 CDR 序列根据 Kabat 规则进行定义。

3. mab95 的人源化改造

鼠源抗体 mab95 的人源化轻链模板为 IGKV3-20*02 和 IGKV1-40*01, 人源化重链模板为 IGHV1-3*01, 将鼠源抗体 mab95 的 CDR 分别移植到其人源模板中, 进而, 对人源化抗体的 FR 部分氨基酸进行回复突变改造, 其中轻链可变区回复突变包括 45P、46W、48Y、69S 或 70Y 中的一个或多个, 重链可变区回复突变包括 27F、38K、48I、67K、68A、70L 或 72F 中的一个或多个 (轻链可变区和重链可变区中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定), 得到具有不同序列的轻链可变区和重链可变区。即获得含有 mab95 的 CDR 的人源化抗体, 其可变区序列如下:

mAb95 人源化抗体可变区具体序列如下:

Hu95-VL1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 所示:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWHYQQKPGQAPRPWIYATSNLASG
IPARFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Hu95-VL2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 78 所示:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWHYQQKPGQSPRPWIYATSNLASG
VPARFSGSGSGTSYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Hu95-VL3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 79 所示:

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCRASSSVSYIHWHYQQLPGTAPKPWIYATSNLASGV
PDRFSGSKSGTSYSLAITGLQAEDEADYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Hu95-VL4 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 80 所示:

EIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCRASSSVSYIHWHYQQLPGTSPKPWIYATSNLASGV
PDRFSGSKSGTSYSLAITGLQAEDEADYYCQQWNSNPWTFGGGTKVEIK

Hu95-VH1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 81 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWMGLVY
PYNGGTAYNOKFKDRVTLTFTDSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFD
YWGQGTTVTVSS

Hu95-VH2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWIGLVYP

YNGGTAYNQKFKDRATLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDV
WGQGTTVTVSS

Hu95-VH3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 83 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWMGLVY
PYNGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFD
VWGQGTTVTVSS

Hu95-VH4 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 84 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWIGLVYP
YNGGTAYNQKFKDKATLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLIPGTTSYFDV
WGQGTTVTVSS

Hu95-VH5 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 85 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGFTFTNYAIHWVKQAPGQRLEWMGLVYP
YTGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGMIPGTNSYFDV
VWGQGTTVTVSS。

注：下划线为以 Kabat 规则定义的 CDR 序列，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3- CDR3-FR4。

其中，Hu95-VH5 的 CDR 区进行了进一步的修饰，其 HCDR1 如 SEQ ID NO: 102 (NYAIH) 所示，HCDR2 如 SEQ ID NO: 103 (LVYPYTGGTAYNQKFKD) 所示，HCDR3 如 SEQ ID NO: 104 (WGMIPGTNSYFDV) 所示。

4. 抗 CTGF 人源化全长抗体的构建和表达

设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VL 基因片段，再与表达载体 pHr (带信号肽及恒定区基因 (CH/CL) 片段) 进行同源重组，构建抗体全长表达载体 VH-CH-pHr/VL-CL-pHr。所述人源化抗体的恒定区可选自人 κ 、 λ 链轻链恒定区，以及选自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，非限制性实施包括对人 IgG1、IgG2、IgG4 的恒定区进行优化设计，改善抗体功能，如恒定区的 M252Y/S254T/T256E ("YTE") 位点突变可以延长抗体的半衰期，S228P、F234A 和 L235A 等其他恒定区位点突变等。

示例性的抗 CTGF 人源化抗体恒定区序列如下:

重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示(所形成的全长抗体重链的名称后缀为 w)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

YTE 改造抗体的重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示 (所形成全长

抗体重链的名称后缀为 y)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

抗 CTGF 人源化抗体的轻链 kappa 恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示
(所形成全长抗体重链的名称后缀为 k)：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

抗 CTGF 人源化抗体轻链 lambda 恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示(所
形成全长抗体重链的名称后缀为 l)：

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

人源化抗体的重链可变区与 SEQ ID NO: 37 所示的重链恒定区连接, 以及人源
化抗体的轻链可变区与 SEQ ID NO: 39 所示的轻链 kappa 恒定区连接形成的来源自
mab147 的全长人源化抗体包括：

表 6

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

人源化抗体重链的可变区与 SEQ ID NO: 38 所示的重链恒定区 YTE 变体连接,
以及人源化抗体的轻链可变区与 SEQ ID NO: 39 所示的轻链 kappa 恒定区连接形成
的来源自 mab147 的全长人源化抗体包括：

表 7

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

人源化抗体重链可变区与 SEQ ID NO: 37 所示的重链恒定区连接, 以及人源化

抗体轻链可变区与 SEQ ID NO: 40 所示的轻链 lambda 恒定区连接形成的来源于 mab164 的全长人源化抗体包括:

表 8

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

人源化抗体重链可变区与 SEQ ID NO: 38 所示的重链恒定区 YTE 变体连接, 以及人源化抗体轻链可变区与 SEQ ID NO: 40 所示的轻链 lambda 恒定区连接形成的来源于 mab164 的全长人源化抗体包括:

表 9

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

人源化抗体重链可变区与 SEQ ID NO: 37 所示的重链恒定区连接, 以及人源化抗体轻链可变区与 SEQ ID NO: 39 所示的轻链 kappa 恒定区连接形成的来源于 mab95 的全长人源化抗体包括:

表 10

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

人源化抗体重链可变区与 SEQ ID NO: 38 所示的重链恒定区 YTE 变体连接, 以及人源化抗体轻链可变区与 SEQ ID NO: 39 所示的轻链 kappa 恒定区连接形成的来源于 mab95 的全长人源化抗体包括:

表 11

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

示例性的抗 CTGF 抗体全长氨基酸序列如下：

表 12 全长抗体的轻链或重链

全长抗体轻链或重链 (SEQ ID NO)	氨基酸序列
Ch147 重链 (SEQ ID NO: 41)	<u>EVQLVESGGGLVQPEGSLKLSAASGFSFNTYAMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVAR</u> <u>IRTKSN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSESM</u> <u>LYLQMNNLKTEDTAMYYCVETGF</u> <u>AYWDQGLTVTVS</u> <u>AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Ch147 轻链 (SEQ ID NO: 42)	<u>QIVLTQSPA</u> <u>IMASAPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQOKPGTSPKLWIYSTNLA</u> <u>SGVPARFSGSGSTSYSLISRMEADAATYYCQORSSYPLTFGAGTKLELKR</u> TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
人源化抗体 Hu147-11wk、 Hu147-12wk、 Hu147-13wk、 Hu147-14wk 和 Hu147-15wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 43)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSTYAMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVGR</u> <u>IRTKSN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGF</u> <u>AYWDQGLTVTVS</u> <u>AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
人源化抗体 Hu147-21wk、 Hu147-22wk、 Hu147-23wk、 Hu147-24wk 和 Hu147-24wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 44)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFNTYAMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVAR</u> <u>IRTKSN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSESLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGF</u> <u>AYWDQGLTVTVS</u> <u>AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
人源化抗体 Hu147-31wk、 Hu147-32wk、 Hu147-33wk、 Hu147-34wk 和 Hu147-35wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 45)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFSFNTYAMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVAR</u> <u>IRTKSN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSESLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGF</u> <u>AYWDQGLTVTVS</u> <u>AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
人源化抗体 Hu147-11yk、 Hu147-12yk、 Hu147-13yk、	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSTYAMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWVGR</u> <u>IRTKSN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGF</u> <u>AYWDQGLTVTVS</u> <u>AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY

Hu147-14yk 和 Hu147-15yk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 46)	ITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
人源化抗体 Hu147-21yk、 Hu147-22yk、 Hu147-23yk、 Hu147-24yk 和 Hu147-24yk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 47)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR</u> <u>IRTKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGF</u> <u>AYWDQGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY ITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
人源化抗体 Hu147-31yk、 Hu147-32yk、 Hu147-33yk、 Hu147-34yk 和 Hu147-35yk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 48)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR</u> <u>IRTKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSESSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVETGF</u> <u>AYWDQGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY ITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
人源化抗体 Hu147-11wk、 Hu147-21wk 和 Hu147-31wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 49)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCAASSSVSYMHWFQKPGQSPRLLIYSTSNLA</u> <u>SGIPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKEIKR</u> TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (同时也是 Hu147-11yk、Hu147-21yk 和 Hu147-31yk 的全长轻链)
人源化抗体 Hu147-12wk、 Hu147-22wk 和 Hu147-32wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 50)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCAASSSVSYMHWFQKPGQSPKLLIYSTSNLA</u> <u>SGIPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKEIKR</u> TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (同时也是 Hu147-12yk、Hu147-22yk 和 Hu147-32yk 的全长轻链)
人源化抗体 Hu147-13wk、 Hu147-23wk 和 Hu147-33wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 51)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCAASSSVSYMHWFQKPGQSPKLLIYSTSNLA</u> <u>SGVPARFSGSGSGTDYTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGQGTKEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (同时也是 Hu147-13yk、Hu147-23yk 和 Hu147-33yk 的全长轻链)
人源化抗体 Hu147-14wk、 Hu147-24wk 和 Hu147-34wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 52)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQKPGKSPKLLIYSTSNLA</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (同时也是 Hu147-14yk、Hu147-24yk 和 Hu147-34yk 的全长轻链)
人源化抗体 Hu147-15wk、 Hu147-25wk 和	<u>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWFQKPGKSPKLLIYSTSNLA</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGQGTKEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ

Hu147-35wk 的全长轻链 (SEQ ID NO: 53)	SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (同时也是 Hu147-15yk、Hu147-25yk 和 Hu147-35yk 的全长轻链)
Ch164 重链 (SEQ ID NO: 54)	<u>QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTFGVHWIRQSPGKGLEWLGVI</u> <u>WRRGGTDYNAAFMSRLSITKDNSRSHVFFKMTSLQTDDSAIYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Ch164 轻链 (SEQ ID NO: 55)	<u>QAVVTQESALTTSPGGTVILTCRSSIGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGT</u> <u>SNRAPGVPVRFSGSLIGDKAALTITGAQAEDDAMYFCALWYSTHYVFGGGT</u> KVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DGSPVKAGVETTKPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTEC
Hu164-57wl、 Hu164-58wl 和 Hu164-59wl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 56)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTTFGVHWIRQPPGKALEWLAVIW</u> <u>RRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-67wl、 Hu164-68wl 和 Hu164-69wl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 57)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTTFGVHWIRQPPGKGLEWLGVIW</u> <u>RRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVFTMTNMDPVDATYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-77wl、 Hu164-78wl 和 Hu164-79wl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 58)	<u>EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWIGVIW</u> <u>RRGGTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGGFDY</u> <u>WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-87wl、 Hu164-88wl 和 Hu164-89wl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 59)	<u>EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWLGVI</u> <u>WRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKNQVSFKLSSVTAADTAVYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV

	YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-57yl、 Hu164-58yl 和 Hu164-59yl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 60)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKALEWLAVIW</u> <u>RRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATATYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-67yl、 Hu164-68yl 和 Hu164-69yl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 61)	<u>EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTFGVHWIRQPPGKGLEWLGVW</u> <u>RRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATATYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-77yl、 Hu164-78yl 和 Hu164-79yl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 62)	<u>EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWIGVIW</u> <u>RRGGTDYNAAFMSRVLTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGGFDY</u> <u>WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-87yl、 Hu164-88yl 和 Hu164-89yl 的全长 重链 (SEQ ID NO: 63)	<u>EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSISTFGVHWIRQHPGKGLEWLGVI</u> <u>WRRGGTDYNAAFMSRLTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGGFD</u> <u>YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Hu164-57wl、 Hu164-67wl、 Hu164-77wl 和 Hu164-87wl 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 64)	<u>ETVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGG</u> <u>TSNRAPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSTHYVFGGG</u> <u>TKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA</u> DGSPVKAGVETTKPSKQSNKYYASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTEC (同时也是 Hu164-57yl、Hu164-67yl、Hu164-77yl 和 Hu164-87yl 的全长轻链)
Hu164-58wl、 Hu164-68wl、 Hu164-78wl 和 Hu164-88wl 的全长	<u>ETVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSIGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIGG</u> <u>TSNRAPGVDPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSTHYVFGGG</u> <u>TKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA</u> DGSPVKAGVETTKPSKQSNKYYASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTEC

轻链 (SEQ ID NO: 65)	(同时也是 Hu164-58yl、Hu164-68yl、Hu164-78yl 和 Hu164-88yl 的全长轻链)
Hu164-59yl、 Hu164-69yl、 Hu164-79yl 和 Hu164-89yl 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 66)	<u>ESVVTQPPSVSGAPGQRTISCRSSIGAVTTSNYANWVQQLPGTAFKGLIGG</u> <u>TSNRAPGVDPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCALWYSTHYVFGGGT</u> <u>KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA</u> <u>DGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE</u> <u>GSTVEKTVAPTEC</u> (同时也是 Hu164-59yl、Hu164-69yl、Hu164-79yl 和 Hu164-89yl 的全长轻链)
Ch95 重链 (SEQ ID NO: 86)	<u>EVLLQQSGPVLVKPGPSVKISCKASGFTFTNYDIHWVKQSHGKSLEWIGLVY</u> <u>PYNGGTAYNQKFKDKATLTFDTSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARWGLIPG</u> <u>TTSYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY</u> <u>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKP</u> <u>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u> <u>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS</u> <u>LSLSPGK</u>
Ch95 轻链 (SEQ ID NO: 87)	<u>QIVLSQSPILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQQKPRSSPKPWYATSNLA</u> <u>SGVPARFSGSGSTYSLSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPWTFGGTRLEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ</u> <u>SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP</u> <u>VTKSFNRGEC</u>
Hu95-11wk、 Hu95-12wk、 Hu95-13wk 和 Hu95-14wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 88)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWMGL</u> <u>VYPYNGGTAYNQKFKDRVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ</u> <u>TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u>
Hu95-21wk、 Hu95-22wk、 Hu95-23wk 和 Hu95-24wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 89)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWIGLV</u> <u>YYPYNGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> <u>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT</u> <u>YICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</u> <u>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u>
Hu95-31wk、 Hu95-32wk、 Hu95-33wk 和 Hu95-34wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 90)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWMGL</u> <u>VYPYNGGTAYNQKFKDKVTLTFDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWQGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ</u> <u>TYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u>

Hu95-41wk、 Hu95-42wk、 Hu95-43wk 和 Hu95-44wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 91)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWIGL</u> <u>VYPYNGGTAYNQKFKDKATLTFTDSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Hu95-51wk、 Hu95-52wk、 Hu95-53wk 和 Hu95-54wk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 92)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYAIHWVKQAPGQRLEWMGL</u> <u>VYPYTGGTAYNQKFKDKVLTFTDSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARWGLI</u> <u>PGTNSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Hu95-11yk、 Hu95-12yk、 Hu95-13yk 和 Hu95-14yk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 93)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWMGL</u> <u>VYPYNGGTAYNQKFKDRVLTFTDSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Hu95-21yk、 Hu95-22yk、 Hu95-23yk 和 Hu95-24yk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 94)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVRQAPGQRLEWIGLV</u> <u>YPYNGGTAYNQKFKDRATLTFTDSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARWGLIP</u> <u>GTTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD</u> YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Hu95-31yk、 Hu95-32yk、 Hu95-33yk 和 Hu95-34yk 的全长 重链 (SEQ ID NO: 95)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWMGL</u> <u>VYPYNGGTAYNQKFKDKVLTFTDSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLYITREPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Hu95-41yk、 Hu95-42yk、 Hu95-43yk 和 Hu95-44yk 的全长 重链	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTNYDIHWVKQAPGQRLEWIGL</u> <u>VYPYNGGTAYNQKFKDKATLTFTDSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARWGLI</u> <u>PGTTSYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

(SEQ ID NO: 96)	KPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Hu95-51yk、 Hu95-52yk、 Hu95-53yk 和 Hu95-54yk 的全长重 链 (SEQ ID NO: 97)	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGFTFTNYAIHWVKQAPGQRLEWMGL</u> <u>VYPYTGGTAYNQKFKDKVTLTFTDSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGM</u> <u>PGTNSYFDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ</u> <u>TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u>
Hu95-11wk、 Hu95-21wk、 Hu95-31wk、 Hu95-41wk 和 Hu95-51wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 98)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWHYQQKPGQAPRPWIYATSNL</u> <u>ASGIPARFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPWTFGGG</u> <u>KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL</u> <u>QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS</u> <u>PVTKSFNRGEC</u> (同时也是 Hu95-11yk、Hu95-21yk、Hu95-31yk、Hu95-41yk 和 Hu95-51yk 的全长轻链)
Hu95-12wk、 Hu95-22wk、 Hu95-32wk、 Hu95-42wk 和 Hu95-52wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 99)	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIHWHYQQKPGQSPRPWIYATSNLA</u> <u>SGVPARFSGSGSGTSTYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPWTFGGG</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL</u> <u>QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP</u> <u>VTKSFNRGEC</u> (同时也是 Hu95-12yk、Hu95-22yk、Hu95-32yk、Hu95-42yk 和 Hu95-52yk 的全长轻链)
Hu95-13wk、 Hu95-23wk、 Hu95-33wk、 Hu95-43wk 和 Hu95-53wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 100)	<u>ESVLTQPPSVSGAPGQRTISCRASSSVSYIHWHYQQLPGTAPKPWIYATSNLA</u> <u>SGVPDRFSGSKSGTSTYSLAITGLQAEDEADYYCQQWNSNPWTFGGG</u> <u>KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL</u> <u>QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS</u> <u>PVTKSFNRGEC</u> (同时也是 Hu95-13yk、Hu95-23yk、Hu95-33yk、Hu95-43yk 和 Hu95-53yk 的全长轻链)
Hu95-14wk、 Hu95-24wk、 Hu95-34wk、 Hu95-44wk 和 Hu95-54wk 的全长 轻链 (SEQ ID NO: 101)	<u>EIVLTQPPSVSGAPGQRTISCRASSSVSYIHWHYQQLPGTSPKPWIYATSNLAS</u> <u>GVPDRFSGSKSGTSTYSLAITGLQAEDEADYYCQQWNSNPWTFGGG</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ</u> <u>SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP</u> <u>VTKSFNRGEC</u> (同时也是 Hu95-14yk、Hu95-24yk、Hu95-34yk、Hu95-44yk 和 Hu95-54yk 的全长轻链)

作为阳性对照的 CTGF 抗体 mAb1 (来源于 CN1829740B, 抗体名称为 pamrevlumab, 又名 FG-3019) 的序列如下:

重链: (SEQ ID NO: 67)

EGQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGIG
TGGGTYSTDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGDYYGSG
SFFDCWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

轻链：(SEQIDNO: 68)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGQGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGEC

实施例 1-3. CTGF 抗体的结合活性检测

一、CTGF 抗体结合人 CTGF 蛋白的 ELISA 实验

抗人 CTGF 抗体的结合力通过抗体与人 CTGF 蛋白的 ELISA 实验和 Biacore 来检测。用 CTGF 重组蛋白直接包被在 96 孔酶标板中，抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和 CTGF 的结合活性。具体实验方法如下：

用 pH 7.4 的 PBS（上海源培，Cat No. B320）缓冲液将 CTGF 蛋白（R&D，Cat No. 9190-CC）稀释至 0.2μg/mL 浓度，以 50μL/孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning，Cat No. CLS3590-100EA）中，于 37℃ 孵育箱中放置 2 小时或 4℃ 放置过夜（16-18 小时）。弃去液体后，加入用 PBS 稀释的 5% 脱脂牛奶（BD skim milk，Cat No. 232100）封闭液 250μL/孔，37℃ 孵育箱孵育 3 小时或 4℃ 放置过夜（16-18 小时）进行封闭。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（含 0.1% Tween-20 的 PBS，pH7.4）洗板 5 次后，加入 50μL/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体（杂交瘤纯化抗体或人源化抗体），放于 37℃ 孵育箱孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 50μL/孔用样品稀释液稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 115-035-003）或羊抗人二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003），37℃ 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，加入 50μL/孔 TMB 显色底物（KPL，Cat No. 52-00-03），于室温孵育 5-10min，加入 50μL/孔 1M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪（Molecular Devices, VERSA max）在波长 450nm 处读取吸收值，用 GraphPad Prism 5 分析数据，计算 CTGF 抗体对人 CTGF 蛋白的结合 EC₅₀ 值。实验结果见图 1 及表 13 所示。

表 13. CTGF 抗体结合人 CTGF 蛋白 ELISA 实验结果

受试样品	与人 CTGF 蛋白结合 ELISA 实验 EC ₅₀ (nM)	受试样品	与人 CTGF 蛋白结合 ELISA 实验 EC ₅₀ (nM)
Hu147-11wk	0.045	Hu164-57wl	0.044
Hu147-12wk	0.046	Hu164-67wl	0.044
Hu147-13wk	0.043	Hu164-67yl	0.060

Hu147-14wk	0.073	Hu164-77wl	0.055
Hu147-15wk	0.034	Hu164-87wl	0.055
Hu147-21wk	0.067	Hu164-68wl	0.069
Hu147-22wk	0.056	Hu164-69wl	0.063
Hu147-23wk	0.058	mAb1	0.067
Hu147-24wk	0.048	Hu95-51yk	0.080
Hu147-31wk	0.056		
Hu147-32wk	0.063		
Hu147-33wk	0.054		
Hu147-34wk	0.134		

实验结果显示，本披露的人源化全长抗 CTGF 抗体均与人 CTGF 蛋白有很好的结合作用。

二、CTGF 抗体结合食蟹猴 CTGF 蛋白的 ELISA 实验

抗猴 CTGF 抗体的结合力通过抗体与猴 CTGF 蛋白的 ELISA 实验来检测。用抗-mFc 蛋白直接包被在 96 孔酶标板中，后续用带有 Fc 标签的 cyno-CTGF 蛋白与板子结合，然后加入抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和 cyno-CTGF 的结合活性。具体实验方法如下：

用 pH7.4 的 PBS（上海源培，Cat No. B320）缓冲液将抗-mFc 蛋白（Sigma, Cat No. M4280）稀释至 2 μ g/mL 浓度，以 50 μ l/孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning, Cat No. CLS3590-100EA）中，于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中放置 2 小时。弃去液体后，加入用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶（BD skim milk, Cat No.232100）封闭液 250 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 3 小时或 4 $^{\circ}$ C 放置过夜（16-18 小时）进行封闭。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（含 0.1% Tween-20 的 PBS，pH7.4）洗板 3 次后，每孔加入 50 μ l 的 1 μ g/mL 的 cyno-CTGF-mFc 蛋白，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 1 小时后，用 PBST 缓冲液（含 0.1% Tween-20 的 PBS，pH7.4）洗板 3 次后，加入 50 μ L/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体（杂交瘤纯化抗体或人源化抗体），放于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 50 μ l/孔用样品稀释液稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗（Jackson Immuno Research, Cat No. 115-035-003）或羊抗人二抗（Jackson Immuno Research, Cat No. 109-035-003），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 5 次后，加入 50 μ L/孔 TMB 显色底物（KPL, Cat No. 52-00-03），于室温孵育 5-10min，加入 50 μ L/孔 1M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪（Molecular Devices, VERSA max）在波长 450nm 处读取吸收值，用 GraphPad Prism 5 分析数据，计算 CTGF 抗体对食蟹猴 CTGF 蛋白的结合 EC50 值。实验结果见表 14 所示。

表 14. CTGF 抗体结合食蟹猴 CTGF 蛋白 ELISA 实验结果

受试样品	EC50 (nM)	受试样品	EC50 (nM)	受试样品	EC50 (nM)
Hu147-11wk	0.052	Hu147-23wk	0.063	Hu164-57wl	0.029
Hu147-12wk	0.062	Hu147-24wk	0.080	Hu164-67wl	0.028
Hu147-13wk	0.043	Hu147-31wk	0.070	Hu164-77wl	0.038
Hu147-14wk	0.077	Hu147-32wk	0.079	Hu164-87wl	0.034
Hu147-15wk	0.053	Hu147-33wk	0.044	Hu164-68wl	0.036
Hu147-21wk	0.053	Hu147-34wk	0.144	Hu164-69wl	0.032

Hu147-22wk	0.073	Hu95-51yk	0.059	mAb1	0.086
------------	-------	-----------	-------	------	-------

实验结果表明，本披露的人源化抗 CTGF 抗体均与猴 CTGF 蛋白有很好的结合作用。

三、CTGF 抗体与小鼠 CTGF 蛋白的 ELISA 实验

抗小鼠 CTGF 抗体的结合力通过抗体与小鼠 CTGF 蛋白的 ELISA 实验来检测。用小鼠-CTGF 融合蛋白直接包被在 96 孔酶标板中，抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和小鼠-CTGF 的结合活性。具体实验方法如下：

用 pH7.4 的 PBS（上海源培，Cat No. B320）缓冲液将小鼠 CTGF-his 蛋白稀释至 0.5 μg/mL 浓度，以 50 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning，Cat No. CLS3590-100EA）中，于 37℃ 孵育箱中放置 2 小时。弃去液体后，加入用 PBS 稀释的 5% 脱脂牛奶（BD skim milk, Cat No.232100）封闭液 250 μL/孔，37℃ 孵育箱孵育 3 小时或 4℃ 放置过夜（16-18 小时）进行封闭。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液（pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20）洗板 3 次后，加入 50 μL/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体（杂交瘤纯化抗体或人源化抗体），放于 37℃ 孵育箱孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 50 μL/孔用样品稀释液稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 115-035-003）或羊抗人二抗（Jackson Immuno Research，Cat No. 109-035-003），37℃ 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 5 次后，加入 50 μL/孔 TMB 显色底物（KPL，Cat No. 52-00-03），于室温孵育 5-10min，加入 50 μL/孔 1M H₂SO₄ 终止反应，用酶标仪（Molecular Devices, VERSA max）在波长 450nm 处读取吸收值，用 GraphPad Prism 5 分析数据，计算 CTGF 抗体对小鼠 CTGF 蛋白的结合 EC₅₀ 值。实验结果见表 15 所示。

表 15. CTGF 抗体结合小鼠 CTGF 蛋白 ELISA 实验结果

受试样品	EC50 (nM)	受试样品	EC50 (nM)	受试样品	EC50 (nM)
Hu147-11wk	0.228	Hu147-23wk	0.200	Hu164-57wl	0.041
Hu147-12wk	0.249	Hu147-24wk	0.263	Hu164-67wl	0.049
Hu147-13wk	0.127	Hu147-31wk	0.320	Hu164-77wl	0.058
Hu147-14wk	0.431	Hu147-32wk	0.349	Hu164-87wl	0.067
Hu147-15wk	0.159	Hu147-33wk	0.258	Hu164-68wl	0.065
Hu147-21wk	0.247	Hu147-34wk	0.664	Hu164-69wl	0.059
Hu147-22wk	0.336			mAb1	0.077

实验结果表明，本披露的人源化全长抗 CTGF 抗体均与小鼠 CTGF 蛋白有很好的结合作用。

实施例 1-4. CTGF 抗体的功能阻断实验

该试验用 Biacore 仪器检测待测人源化抗 CTGF 抗体对人 TGF-β1 功能的阻断活性。

首先将抗原人 CTGF 以氨基偶联的方式固定到 CM5 生物传感芯片（Cat. # BR-1005-30, GE）上，固化水平 1500 RU，然后于芯片表面流经高浓度的 CTGF 抗

体（150 μg/ml）150 s，再进样 50 nM TGF-β1 蛋白 120 s，用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个试验循环解离完成后，用再生缓冲液将生物传感芯片洗净再生。

试验得到的数据用 GE Biacore T200 Evaluation version 3.0 软件进行统计分析。

阻断效率（Blocking efficiency）=[1-（样品响应值/空白对照响应值）]×100%。
具体结果见表 16 所示。

表 16. CTGF 抗体的功能阻断实验结果

受试样品	功能阻断百分率 (%)	受试样品	功能阻断百分率 (%)
Hu147-11wk	50.8%	Hu147-24wk	52.8%
Hu147-12wk	51.6%	Hu147-31wk	55.0%
Hu147-13wk	53.3%	Hu147-32wk	55.2%
Hu147-14wk	50.9%	Hu147-33wk	57.3%
Hu147-15wk	52.3%	Hu147-34wk	56.2%
Hu147-21wk	51.6%	Hu164-67wl	55.5%
Hu147-22wk	52.3%	Hu164-67yl	53.9%
Hu147-23wk	54.6%	mAb1	41.3%

试验结果表明，本披露的人源化抗 CTGF 抗体均具有高功能阻断活性。

抗 CTGF 抗体亲和力的 Biacore 测定

该试验用 Biacore 仪器测定待测人源化抗 CTGF 抗体与人 CTGF、小鼠 CTGF 的亲和力。

分别用 Protein A 生物传感芯片（Cat. # 29127556, GE）亲和捕获一定量的待测抗体，然后于芯片表面流经一定浓度的人、鼠 CTGF 抗原，利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后，pH1.5 的甘氨酸-盐酸再生溶液（Cat. # BR-1003-54, GE）将生物芯片洗净再生。试验运行缓冲液为 1×HBS-EP 缓冲溶液（Cat. # BR-1001-88, GE）。

试验得到的数据用 GE Biacore T200 Evaluation version 3.0 软件以（1:1）Langmuir 模型进行拟合，得出亲和力数值，具体见表 17、18 所示。

表 17. CTGF 抗体与人 CTGF 蛋白的反应亲和力

抗体	ka（1/Ms）	kd（1/s）	KD（M）
Ch147	1.49E+07	6.93E-03	4.66E-10
Ch164	6.62E+07	8.83E-03	1.33E-10
Ch95	7.85E+06	3.02E-02	3.85E-09
Hu147-11wk	2.98E+07	3.36E-02	1.13E-09
Hu147-12wk	3.41E+07	3.30E-02	9.69E-10
Hu147-13wk	2.97E+07	2.40E-02	8.08E-10
Hu147-14wk	4.89E+07	5.54E-02	1.13E-09
Hu147-21wk	1.66E+07	1.62E-02	9.74E-10
Hu147-22wk	1.40E+07	1.42E-02	1.01E-09

Hu147-23wk	1.37E+07	1.12E-02	8.18E-10
Hu147-31wk	1.78E+07	1.59E-02	8.94E-10
Hu147-32wk	1.46E+07	1.33E-02	9.10E-10
Hu147-33wk	1.45E+07	1.04E-02	7.13E-10
Hu147-34wk	1.47E+07	1.55E-02	1.05E-09
Hu164-57wl	4.26E+07	2.94E-03	6.91E-11
Hu164-67wl	5.17E+07	1.96E-03	3.79E-11
Hu164-67yl	3.43E+07	2.27E-03	6.62E-11
Hu164-77wl	5.15E+07	1.76E-02	3.43E-10
Hu164-87wl	1.05E+08	2.04E-02	1.94E-10
Hu164-68wl	3.84E+07	1.16E-02	3.02E-10
Hu164-69wl	8.71E+07	2.80E-02	3.22E-10
Hu95-21wk	4.09E+06	3.03E-02	7.39E-09
Hu95-31wk	5.59E+06	3.26E-02	5.84E-09
Hu95-41wk	7.70E+06	4.08E-02	5.29E-09
Hu95-42wk	3.32E+06	1.91E-02	5.74E-09
Hu95-51yk	2.84E+07	1.02E-03	3.58E-11

表 18. CTGF 抗体与小鼠 CTGF 蛋白的反应亲和力

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Ch147	3.12E+07	3.84E-02	1.23E-09
Ch164	1.23E+08	1.01E-02	8.22E-11
Ch95	1.38E+07	2.35E-02	1.71E-09
Hu147-11wk	1.20E+08	3.74E-01	3.11E-09
Hu147-12wk	3.75E+07	1.16E-01	3.09E-09
Hu147-13wk	5.73E+07	1.46E-01	2.55E-09
Hu147-23wk	8.18E+07	1.73E-01	2.12E-09
Hu147-31wk	3.83E+07	1.07E-02	2.79E-09
Hu147-32wk	1.37E+08	3.43E-01	2.49E-09
Hu147-33wk	9.01E+07	1.74E-01	1.93E-09
Hu164-57wl	7.35E+07	2.37E-03	3.22E-11
Hu164-67wl	6.36E+07	1.17E-03	1.84E-11
Hu164-67yl	5.34E+07	1.94E-03	3.63E-11
Hu164-77wl	5.98E+07	8.83E-03	1.48E-10
Hu164-87wl	5.24E+07	4.40E-03	8.40E-11
Hu164-68wl	5.70E+07	7.60E-03	1.33E-10
Hu164-69wl	6.17E+07	7.74E-03	1.26E-10
Hu95-21wk	5.29E+06	2.11E-02	3.99E-09
Hu95-31wk	7.84E+06	2.25E-02	2.87E-09
Hu95-41wk	1.39E+07	3.39E-02	2.44E-09

Hu95-42wk	5.66E+06	1.37E-02	2.42E-09
Hu95-51yk	2.56E+07	5.16E-04	2.02E-11

试验结果表明，来源自鼠源抗体 mAb147 和 mAb164 的嵌合抗体 Ch147 和 Ch164 及人源化抗 CTGF 抗体均能与 人 CTGF 和小鼠 CTGF 以高亲和力结合，多种来源抗体种系 FR 区的替换和回复突变改造均不影响人源化抗体的亲和力，部分改造甚至会增强抗体与抗原的亲和力。

实施例 1-5. CTGF 抗体对 TGFβ 诱导的 C2C12 细胞体外迁移抑制实验

C2C12 细胞（小鼠成肌细胞，中科院细胞库，#GNM26）用 0.25%胰酶（Gibco，#25200-072）消化，离心后用无血清的 DMEM 培养基（Gibco，#10564-029）重悬。用无血清的 DMEM 培养基配制细胞-抗体混合物及 TGFβ1-抗体混合物，细胞密度为 2×10⁵/mL，重组人 TGFβ1（Cell signaling Technology，#8915LC）浓度为 10 ng/mL，待测抗体浓度均为 30 μg/mL。

打开 ChemoTx® Disposable Chemotaxis System（Neuro Probe，#106-8）的上盖及过滤膜，将 TGFβ-抗体混合物加入下室中，每孔 30 μL，每组 4 副孔。盖上过滤膜，在膜上加细胞-抗体混合物，每孔加入 50 μL，每组 4 副孔。盖上上盖，置于培养箱（37℃，5% CO₂）中。

孵育 48 小时后，用干净纸巾吸去过滤膜上液体，打开过滤膜，向下室中每孔加入 10 μL 预冷的 0.25%胰酶，盖上过滤膜。消化 5 分钟后，1000rpm 离心 1 分钟。打开过滤膜，向下室中每孔加入 20 μL Cell Titer-Glo 溶液（Promega，#G7573），室温孵育 10 分钟。将液体转移至 384 孔白底板（Thermo Scientific，#267462）中，用酶标仪（BMG，#PheraStar）采用化学发光法读板。用 Graphpad Prism 6 对数据进行分析处理。

抑制率= [(TGFβ 平均值-样品组平均值)/(TGFβ 组平均值-未处理组平均值)] × 100%

表 19. CTGF 抗体对 C2C12 细胞体外迁移实验的抑制结果

受试样品	对 C2C12 细胞体外迁移的抑制百分比 (%)
Hu147-11wk	72.2%
Hu147-33wk	63.8%
Hu164-57wl	75.4%
Hu164-67wl	78.8%
Hu164-67yl	76.5%
Hu164-77wl	72.8%
Hu164-87wl	76.4%
Hu164-68wl	76.3%
Hu164-69wl	74.2%
Hu95-51yk	80.0%
mAb1	63.0%

结果表明,本披露的人源化抗 CTGF 抗体可抑制 TGFβ1 诱导后 C2C12 细胞在体外的迁移能力,对 C2C12 细胞迁移能力的抑制均比阳性对照抗体 mAb1 强。

实施例 1-6. CTGF 抗体对 TGF β 诱导 PANC1 细胞体外迁移抑制实验

PANC-1 细胞 (人胰腺癌细胞, ATCC, #CRL-1469) 用 0.25%胰酶 (Gibco, #25200-072) 消化,离心后用含 0.1%胎牛血清 (Gibco, # 10099-141) 的 DMEM 培养基 (Gibco, #10564-029) 重悬。用含 0.1%胎牛血清的 DMEM 培养基配制细胞-抗体混合物及 TGFβ-抗体混合物,细胞密度为 $4 \times 10^5/\text{mL}$,重组人 TGFβ (Cell signaling Technology, #8915LC) 浓度为 10 ng/mL,待测抗体浓度均为 30 μg/mL。

打开 ChemoTx® Disposable Chemotaxis System (Neuro Probe, #106-8) 的上盖及过滤膜,将 TGFβ-抗体混合物加入下室中,每孔 30 μL,每组 4 副孔。盖上过滤膜,在膜上加细胞-抗体混合物,每孔加入 50 μL,每组 4 副孔。盖上上盖,置于培养箱 (37℃, 5% CO₂) 中。

孵育 48 小时后,用干净纸巾吸去过滤膜上液体,打开过滤膜,向下室中每孔加入 10 μl 预冷的 0.25%胰酶,盖上过滤膜。消化 5 分钟后,1000rpm 离心 1 分钟。在倒置显微镜 (Leica, #DMIL LED) 下计数沉于板底的细胞。用 Graphpad Prism 6 对数据进行分析处理。抑制率= [(TGF β 平均值-样品组平均值) / (TGFβ 组平均值-未处理组平均值)] × 100%

表 20. CTGF 抗体对 PANC1 细胞体外迁移实验的抑制结果

受试样品	对 PANC1 细胞体外迁移的抑制百分比 (%)	受试样品	对 PANC1 细胞体外迁移的抑制百分比 (%)
Hu147-11wk	73.9%	Hu164-77wl	74.3%
Hu147-33wk	77.0%	Hu164-87wl	82.1%
Hu164-57wl	81.2%	Hu164-68wl	76.9%
Hu164-67wl	75.7%	Hu164-69wl	76.9%
Hu164-67yl	78.0%	mAb1	71.7%
Hu95-51yk	80.0%		

结果表明,本披露的人源化抗 CTGF 抗体均可抑制 TGFβ1 诱导后 PANC1 细胞在体外的迁移能力。

实施例 1-7. CTGF 抗体抑制 PANC1 软琼脂体外增殖实验

在琼脂 (BD, #214220) 中加入去离子水,加热配制成 1.4%的凝胶溶液。将 2×DMEM 培养基 (Thermo, #12100046) 与凝胶溶液按照 1:1 的体积比混合,在 24 孔板 (Costar, #3524) 中每孔加入 500 μL,4 度放置使其凝固。

PANC-1 细胞 (人胰腺癌细胞, ATCC, #CRL-1469) 用 0.25%胰酶 (Gibco, #25200-072) 消化,离心后用含 4%胎牛血清 (Gibco, # 10099-141) 的 DMEM 培养基 (GE, #SH30243.01) 调整细胞密度至 5×10^4 个/mL。用 2×DMEM 培养基配制抗体至 2 mg/mL。将细胞、抗体及 1.4%的凝胶溶液按照 2:1:1 的体积比混合,在铺了底层胶的 24 孔板中每孔加入 200 μL。待上层胶凝固后,在 24 孔板中再加入

200 μL 含 2%胎牛血清的 DMEM 培养基。在培养箱中（37℃，5% CO₂）培养 28 天后，用高内涵分析系统（Molecular Devices，ImageXpress）拍照，并分析形成的细胞克隆面积。抑制率=（1-样品组平均值/未处理组平均值）×100%。实验结果见表 21。

表 21. CTGF 抗体对 PANC1 细胞软琼脂体外增殖实验的抑制结果

受试样品	对 PANC1 细胞体外增殖的抑制百分比（%）
Hu147-11wk	23.76%
Hu147-33wk	22.30%
Hu164-67wl	24.2%
Hu164-67yl	21.7%
Hu95-51yk	20.24%

结果表明，来自 mAb147 和 mAb164 克隆的人源化抗体对人胰腺癌细胞（PANC-1 细胞）的体外增殖具有显著的抑制作用。

实施例 1-8. CTGF 抗体的动物体内生物学活性

一、CTGF 抗体对博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化抑制试验

实验方法：将 40 只小鼠按照体重随机分成以下 4 组：正常对照组（PBS，ip，qod）、mAb1 组（10 mg/kg，ip，qod）、Hu164-67wl（10 mg/kg，ip，qod）组、Hu164-67yl（10 mg/kg，ip，qod）组。每组 10 只，具体分组见下表 21。实验第 1 天按照体重腹腔注射相应溶剂和抗体（10 mL/kg，正常对照和模型组给予 PBS），2 小时后进行博莱霉素雾化（50 mg/8mL 雾化 30 min 并停留 5 min）造模。然后按照上述组别每隔日一次腹腔注射溶剂或抗体，实验周期 21 天，累计腹腔给药共 11 次。实验第 22 天，小鼠腹腔内注射 1%戊巴比妥钠（10 ml/kg）麻醉后，将小鼠仰卧固定在操作台上，沿颈部正中中线切开 1cm 皮肤，切口下缘至胸腔入口处，用止血钳钝性分离皮下结缔组织和肌肉，暴露气管，分离气管两侧及气管与食管间结缔组织，游离气管，插入静脉留置针，使用手术缝线在套管进入气管处结扎固定。以 1 mL 注射器抽吸 0.8 ml PBS，接在静脉套管针进液端，将 PBS 缓缓注入气管，停留 30s 后将 PBS 缓缓回抽，可见回抽出带乳白色泡沫状液体，重复灌洗三次，将灌洗液转移至 EP 管中，再吸取 0.5 ml PBS，重复以上步骤。将两次灌洗液混合后 1500rpm 离心 5 min，保存上清液-20℃待测，BALF 上清再次 10000 rpm 离心 10 min 后取上清检测可溶性胶原（试剂盒：Biocolor，批号 AA883）。

表 22. 试验分组及给药情况

组别	动物数量	药物	药物剂量（mg/mL）	给药途径	给药时间
1	10	PBS	-	i.p.	隔日 1 次
2	10	mAb1	10	i.p.	隔日 1 次
3	10	Hu164-67wl	10	i.p.	隔日 1 次
4	10	Hu164-67yl	10	i.p.	隔日 1 次

使用 Excel 统计软件：平均值以 avg（Average，平均值）计算；SD（Standard diviation，标准偏差）值以 STDEV（Standard diviation，标准差）计算；SEM（Standard

Error of Mean，样本均数的标准差）值以 STDEV/SQRT（Square root，开平方根）（每组动物数）计算；GraphPad Prism 软件作图，采用 Two-way ANOVA（双因素方差分析）或 One-way ANOVA（单因素方差分析）对数据进行统计学分析。实验结果见表 23。

表 23. CTGF 抗体对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化抑制试验结果

药物	mAb1（10mpk）	Hu164-67yl（10mpk）	Hu164-67yl（10mpk）
升高胶原抑制率	53.2%	72.8%（p<0.05）	80.7%（p<0.05）

结果显示，Hu164-67yl 或 Hu164-67yl 显示出很强的小鼠肺纤维化抑制作用。

二、CTGF 抗体对 Su86.86 人胰腺癌细胞皮下移植瘤的抑制实验

实验方法：将 SU86.86 细胞（ATCC, CRL-1837、 3.0×10^6 个）200 μ L 接种于 Nu/Nu 裸鼠右肋部皮下，接种 11 天后，待肿瘤体积在 $\sim140\text{mm}^3$ 后去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机分为 5 组，每组 10 只，当天开始给药。通过腹腔注射抗体，每周注射 2 次，共 18 天。每周测 1-2 次瘤体积，称体重，记录数据。分组及给药情况见表 24。

表 24. 试验分组及给药情况

组别	动物数量	药物	药物剂量（mg/kg）	给药途径	给药时间
1	10	人 IgG	40	i.p	每周 2 次
2	10	mAb1	40	i.p	每周 2 次
3	10	Hu164-67yl	40	i.p	每周 2 次
4	10	Hu164-67yl	20	i.p	每周 2 次
5	10	Hu147-33wk	40	i.p	每周 2 次

使用 Excel 统计软件记录数据：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT（每组动物数）计算；采用 GraphPad Prism 软件作图，采用 Two-way ANOVA 或 One-way ANOVA 对数据进行统计学分析。

肿瘤体积（V）计算公式为： $V=1/2\times L_{\text{长}}\times L_{\text{短}}^2$

相对肿瘤增殖率 T/C（%）= $(T_t-T_0)/(C_t-C_0)\times100$ ，其中 T_t 、 C_t 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤体积； T_0 、 C_0 为实验开始时的肿瘤体积。

抑瘤率 TGI（%）= $1-T/C$ （%）。

实验结果：

实验第 1-18 天中（D0 代表实验开始时，D18 代表第 18 天），每周皮下注射给药 2 次，检测 CTGF 抗体对 SU86.86 肿瘤的生长抑制作用。试验结果见表 24 和图 2 所示。与同型人 IgG 的空白对照组相比，mAb1-40mg/kg、Hu164-67yl-40mg/kg、Hu164-67yl-20mg/kg、Hu147-33wk（40mg/kg）组抑瘤率分别为 45%、53%、47% 和 54%，mAb1-40mg/kg、Hu164-67yl -40mg/kg、Hu164-67yl-20mg/kg、Hu147-33wk（40mg/kg）组能够显著抑制 Su86.86 肿瘤的生长（ $p<0.001$ ），且对 SU86.86 肿瘤

的抑制作用具有一定剂量依赖性。另外，各组小鼠体重没有明显变化。

表 25. CTGF 抗体对 SU86.86 小鼠移植瘤的抑制实验结果

分组	平均肿瘤体积 (mm ³)		平均肿瘤体积 (mm ³)		% 抑瘤率	P (vs 空白对照)
	D0	SEM	D18	SEM	D18	
人 IgG	144.35	12.30	1087.10	148.21	-	
mAb1 (40mg/kg)	141.18	11.72	655.75	144.46	45	p<0.001
Hu164-67yl (40mg/kg)	138.75	8.71	582.95	76.14	53	p<0.001
Hu164-67yl (20mg/kg)	139.87	9.33	640.26	96.70	47	p<0.001
Hu147-33wk (40mg/kg)	138.00	10.11	569.66	77.40	54	p<0.001

二、制剂

制剂制备与检测过程中使用的设备、抗体及方法如下：

SEC 分子排阻色谱法：

根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质进行分离的分析的方法。

SEC% (SEC单体含量百分比) = A单体/A总*100% (A单体为样品中主峰单体的峰面积，A总为所有峰面积之和。)

SEC测定用仪器：安捷伦1260；柱子：waters, XBrige BEH200Å SEC(300×7.8mm 3.5μm)。

NR-CE 毛细管凝胶电泳：

将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳，并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

非还原CE纯度百分比=A主峰/A总*100% (A主峰为样品中轻链主峰+重链主峰的峰面积，A总为所有峰面积之和。)

CE测定用仪器：Beckman型号plus800。

iCIEF 成像毛细管等点聚焦电泳：

根据蛋白质等电点pI不同进行分离的技术。

iCIEF中性峰含量百分比=中性峰面积/总面积*100% (总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和)。

iCIEF测定所用仪器厂家simple protein，型号muarice。

渗透压测定：

冰点法测定渗透压，以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础，采用高灵敏度感温元件，测定溶液结冰点，通过电量转化为渗透压。仪器厂家罗泽Loser，型号OM815。

蛋白浓度测定：

蛋白浓度测定仪器：紫外可见分光光度计，型号：Nano Drop oneC，光程为1mm。以下抗体的浓度采用蛋白浓度计。

CTGF抗体

以下实施例所采用的抗CTGF抗体为Hu164-67yl，其中实施例2-1、实施例2-2、实施例2-3、实施例2-4的第1-6号样品以及实施例2-5的第1、2号样品中采用的抗体由蛋白表达后亲和层析得到；实施例2-4的第7、8号样品和实施例2-5的第3-9号样品中采用的抗体由前述抗体经进一步离子交换层析和过滤后得到。

实施例 2-1. 制剂缓冲体系与 pH 值的筛选

配制含有 200 mg/mL Hu164-67yl 的液体制剂，该制剂中还含有 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80（PS80），70mg/mL 蔗糖和不同的缓冲体系。缓冲体系分别为 50 mM 醋酸-醋酸钠盐（AA）pH 5.0、5.5；50 mM 组氨酸-醋酸盐（His-AA）pH 5.5；50 mM 琥珀酸钠盐（SA）pH 5.5；50 mM 枸橼酸钠盐（CA）pH 5.5；50 mM 组氨酸-盐酸盐缓冲剂（His-HCl）pH 5.5、6.0、6.5；50 mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠盐（PB）pH 6.5、7.0。将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖，然后将制剂在 40°C 恒温条件下放置 1 个月，评价 SEC、非还原 CE 等指标。

结果见表 26。SEC 数据显示，40°C 放置 1 个月条件下采用 AA(pH5.5)、His-AA（pH5.5）、CA（pH5.5）、His-HCl（pH5.5）的样品的主峰下降小于其他样品；NR-CE 数据显示，40°C 放置 1 个月条件下，采用 His-HCl（pH5.5）的样品的主峰下降最小（5.1%）。

表 26. pH 和缓冲体系筛选结果

缓冲体系	条件	SEC%	ΔSEC%	NR-CE%	ΔNR-CE%
50mM AA pH 5.0	D0	97.8		93.3	
	40°C M1	91.5	6.3	79.9	13.4
50mM AA pH 5.5	D0	97.8		93.6	
	40°C M1	93.2	4.6	84.0	9.6
50mM His-AA pH 5.5	D0	97.9		93.6	
	40°C M1	92.0	5.9	83.5	10.1
50mM CA pH 5.5	D0	97.9		94.2	
	40°C M1	92.8	5.1	82.2	12.0
50mM SA pH 5.5	D0	97.9		93.4	
	40°C M1	87.3	10.6	76.9	16.5
50mM His-HCl pH 5.5	D0	97.9		93.4	
	40°C M1	92.9	5.0	88.3	5.1

50mM His-HCl pH 6.0	D0	98.0		93.7	
	40°C M1	91.2	6.9	88.0	5.7
50mM His-HCl pH 6.5	D0	98.0		93.4	
	40°C M1	89.8	8.2	86.3	7.1
50mM PB pH 6.5	D0	97.9		93.8	
	40°C M1	88.0	9.9	86.3	7.5
50mM PB pH 7.0	D0	97.8		93.9	
	40°C M1	84.9	12.9	82.5	11.4

注：表中“D”表示天，例如 D7 表示 7 天，以此类推；D0 表示实验开始时；“M”表示月，例如 M1 表示 1 个月，以此类推。

实施例 2-2 长期稳定性试验

制备含有 200 mg/mL Hu164-67yl、50 mM His-HCl (pH 5.5)、70 mg/mL 蔗糖和 0.4 mg/mL PS80。将样品置于 25°C 及 4°C 条件考察稳定性，结果见表 27。

表 27. 长期稳定性试验

条件	SEC%	NR-CE%	iCIEF%
D0	97.9	93.4	57.1
4°C M3	96.7	93.7	57.6
4°C M5	97.4	93.4	57.5
25°C M3	94.0	92.0	51.4
25°C M5	94.3	90.3	46.0

注：表中“M”表示月，例如 M3 表示 3 个月，以此类推。下同。

结果显示：样品在 25°C 条件下放置 5 个月后，纯度项略有下降，但下降幅度均在可接受范围；4°C 条件下放置 5 个月，各检测项均无显著变化，该处方稳定性较好。

实施例 2-3 蛋白浓度的筛选

制备如下配比的液体制剂：

1) 200 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH6.0), 0.4 mg/mL PS80, 70mg/mL 蔗糖

2) 150 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH6.0), 0.4 mg/mL PS80, 70mg/mL 蔗糖

将两种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将样品进行 40°C 稳定性及长期稳定性考察，以 SEC、iCIEF、非还原 CE 作为评价指标。

表 28. 蛋白浓度筛选结果

组别	条件	SEC%	ΔSEC%	NR-CE%	ΔNR-CE%	iCIEF%	ΔiCIEF%
1	D0	98.0		93.7		56.9	
	40°C M1	91.2	6.8	88.0	5.7	35.7	21.2

	25°C M1	96.7	1.3	94.1		52.1	4.8
	25°C M3	93.2	4.8	93.2	0.5	43.0	13.9
	25°C M5	92.3	5.7	90.2	3.5	32.8	24.1
	4°C M3	96.5	1.5	93.9		56.8	0.1
	4°C M5	97.0	1.0	93.0	0.7	56.9	0.0
2	D0	98.0		93.3		56.8	
	40°C M1	91.7	6.3	87.6	5.7	36.0	20.8
	25°C M1	97.0	1.0	93.2	0.1	53.5	3.3
	25°C M3	93.9	4.1	93.2	0.1	50.2	6.6
	25°C M5	94.1	3.9	89.6	3.7	45.2	11.6
	4°C M3	96.6	1.4	94.3		56.2	0.6
	4°C M5	97.3	0.7	93.1	0.2	56.3	0.5

结果显示, 1) 号和 2) 号样品在 40°C M1、25°C M3 和 4°C M5 的条件放置后, 纯度项无明显差异。1) 号样品在 25°C M5 的条件放置后, SEC 和 iCIEF 的主峰下降略多于 2) 号样品。

实施例 2-4 表面活性剂的筛选

制备含 150 mg/mL Hu164-67yl、50mM His-HCl pH 5.5、70 mg/mL 蔗糖和不同的表面活性剂的制剂。将每种制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。取样品进行振摇 (25°C, 300 rpm)、冻融 5 次循环 (FT5C, 条件为 -35°C -2~8°C)、40°C 高温放置及长期稳定性 (4°C M3) 研究, 考察 SEC、非还原 CE 和 iCIEF, 具体处方设计见表 29。

表 29. 表面活性剂种类及浓度筛选结果

组别	缓冲体系	条件	SEC%	NR-CE%	iCIEF%
1	0.2mg/mL PS20	D0	97.8	93.3	56.9
		振摇	97.4	95.1	57.1
		FT5C	96.8	92.2	56.8
		4°C M3	97.6	93.1	58.7
2	0.4mg/mL PS20	D0	97.8	93.4	56.6
		振摇	97.4	95.0	57.0
		FT5C	96.7	92.5	56.7
		4°C M3	97.5	93.4	58.7
3	0.6 mg/mL PS20	D0	97.8	93.9	57.0
		振摇	97.3	94.8	57.5
		FT5C	96.6	92.1	54.0
		4°C M3	97.2	93.5	58.1
4	0.2 mg/mL PS80	D0	97.7	93.3	56.9
		振摇	97.3	95.1	57.1
		FT5C	96.6	92.1	56.6
		4°C M3	97.5	93.7	58.0
5	0.4 mg/mL PS80	D0	97.7	93.8	57.2

		振摇	96.8	95.0	57.1
		FT5C	96.6	92.0	56.7
		4°C M3	97.5	93.7	57.7
6	0.6 mg/mL PS80	D0	97.7	93.3	57.0
		振摇	97.2	94.9	57.1
		FT5C	96.5	92.0	56.2
		4°C M3	97.5	93.4	57.7
7	0.4 mg/mL 泊洛沙姆 188	D0	98.4	95.2	61.9
		40°C M1	94.9	91.1	41.5
8	0.4 mg/mL PS80	D0	98.4	94.7	61.8
		40°C M1	94.2	90.8	40.2

实验结果显示，含有不同种类和浓度的聚山梨酯的样品的纯度检测结果无明显差异。含有相同浓度的 PS80 和泊洛沙姆 188，40°C 放置 1 个月后两组样品纯度无明显差异。

实施例 2-5 制剂处方优化

制备如下配比的液体制剂：

- 1) 200 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 6.0), 70 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80
- 2) 200 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 6.0), 70 mg/mL 海藻糖, 0.4 mg/mL PS80
- 3) 150 mg/mL Hu164-67yl、50 mM His-HCl (pH 5.5)、70 mg/mL 蔗糖和 0.4 mg/mL PS80
- 4) 150 mg/mL Hu164-67yl、50 mM His-HCl (pH 5.5)、70 mg/mL 蔗糖、0.4 mg/mL PS80 和 2% PEG 3350
- 5) 150 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5.5), 70 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80 和 50 mM 精氨酸
- 6) 150 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5.5), 70 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80 和 1% 甘露醇
- 7) 150 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5.5), 70 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80 和 0.5 mM EDTA
- 8) 150 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5.5), 70 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80 和 5 mM EDTA
- 9) 150 mg/mL Hu164-67yl, 50 mM His-HCl (pH 5.5), 70 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80 和 10 mM EDTA

将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将样品进行 40°C 稳定性考察，以 SEC、iCIEF、非还原 CE 作为评价指标。

表 30. 处方优化

组别	条件	SEC%	Δ SEC%	NR-CE%	Δ NR-CE%	iCIEF%	Δ iCIEF%
1	D0	98.0		93.7		56.9	
	40°C M1	91.2	6.1	88.0	5.7	35.7	21.2
2	D0	98.0		93.5		56.8	
	40°C M1	90.8	7.2	88.9	4.6	34.0	22.8
3	D0	98.4		94.7		61.8	
	40°C M1	94.2	4.2	90.8	3.9	40.2	21.6
4	D0	98.3		94.4		61.5	
	40°C M1	94.3	4.0	90.5	3.9	40.6	20.9
5	D0	98.4		94.5		61.7	
	40°C M1	94.2	4.2	91.0	3.5	40.6	21.1
6	D0	98.0		95.1		60.7	
	40°C M1	94.1	3.9	91.1	4.0	40.1	20.6
7	D0	98.3		94.8		61.7	
	40°C M1	94.7	3.6	91.8	3.0	41.0	20.7
8	D0	98.3		94.6		61.6	
	40°C M1	94.7	3.6	91.6	3.0	40.9	20.7
9	D0	98.3		94.5		62.2	
	40°C M1	94.7	3.6	92.2	2.3	40.7	21.5

结果显示：样品在 40°C 放置 1 个月后，只加蔗糖的样品和加入其他稳定剂的样品的纯度无显著差异，各条件下处方稳定性良好。该结果提示蔗糖以外其他稳定剂的加入不会影响处方稳定性，并且不含其他稳定剂的处方已达到含其他稳定剂处方的稳定效果。

权利要求书：

1. 一种药物组合物，包含抗 CTGF 抗体和缓冲剂，其中所述抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

5 i) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

ii) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

10 ii-i) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 69 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 70 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

ii-ii) 所述重链可变区包含与如 SEQ ID NO: 85 所示的重链可变区相同序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含与如 SEQ ID NO: 70 所示的轻链可变区相同序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

15 所述缓冲剂是组氨酸盐缓冲剂，优选为组氨酸-盐酸盐缓冲剂或组氨酸-醋酸盐缓冲剂，更优选为组氨酸-盐酸盐缓冲剂。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述抗 CTGF 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

20 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

25 优选的，所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示；

更优选的，所述抗 CTGF 抗体包含如 SEQ ID NO: 61 所示的重链和如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为约 30 5.0 至约 6.5，优选为约 5.0 至约 6.0，更优选为约 5.5。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的药物组合物，其中所述抗 CTGF 抗体的浓度为约 100 mg/mL 至约 200 mg/mL，优选为约 150 mg/mL 至约 200 mg/mL，更优选为约 150 mg/mL。

35

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含表面活性剂，所述表面活性剂优选为聚山梨酯或泊洛沙姆，更优选为聚山梨酯

80、聚山梨酯 20 或泊洛沙姆 188，最优选为聚山梨酯 80。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为约 0.05 mg/mL 至约 1.0 mg/mL，优选为约 0.2 mg/mL 至约 0.6 mg/mL，更优选为约 0.4 mg/mL。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还含糖，所述糖优选选自蔗糖、甘露醇和海藻糖中的一种或多种，更优选为蔗糖。

8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物，其中所述糖的浓度为约 20 mg/mL 至约 100 mg/mL，优选为约 40 mg/mL 至约 80 mg/mL，更优选为约 70 mg/mL。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为约 5 mM 至约 100 mM，优选为约 30 mM 至约 70 mM，更优选为约 50 mM。

10. 根据权利要求 1 至 9 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含稳定剂，所述稳定剂选自 PEG、精氨酸和 EDTA。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 约 150 mg/mL 至约 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.2 mg/mL 至约 0.6 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 约 40 mg/mL 至约 80 mg/mL 的糖，和 (d) 约 30 mM 至约 70 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.0 至约 6.0；

优选地，所述药物组合物包含如下组分：

(a) 约 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 约 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 约 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5 至约 5.7；所述抗 CTGF 抗体包含如 SEQ ID NO: 61 所示的重链和如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链。

12. 一种冻干制剂，所述冻干制剂复溶后可形成权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物。

13. 一种制备冻干制剂的方法，其包括将权利要求 1 至 11 中任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

14. 一种冻干制剂，所述制剂通过将权利要求 1 至 11 中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

15. 一种复溶溶液，所述复溶溶液是通过将权利要求 12 或 14 所述的冻干制剂经复溶制备；

优选地，所述复溶溶液包含：

(a) 约 150 mg/mL 至约 200 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.2 mg/mL 至约 0.6 mg/mL 的聚山梨酯，(c) 约 40 mg/mL 至约 80 mg/mL 的糖，和 (d) 约 30 mM 至约 70 mM 的组氨酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.0 至约 6.0；

更优选地，所述复溶溶液包含：

(a) 约 150 mg/mL 的所述抗 CTGF 抗体，(b) 约 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 约 70 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 约 50 mM 的组氨酸-盐酸盐缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为约 5.5 至约 5.7；所述抗 CTGF 抗体包含如 SEQ ID NO: 61 所示的重链和如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链。

16. 根据权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物或权利要求 15 所述的复溶溶液，其为静脉注射制剂、皮下注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂；优选为静脉注射制剂。

17. 一种制品，其包括容器，该容器中装有如权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物、权利要求 12 或 14 所述的冻干制剂或权利要求 15 所述的复溶溶液。

18. 一种治疗或预防与 CTGF 相关的疾病的方法，所述方法包括给予受试者有效量的权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物、权利要求 12 或 14 所述的冻干制剂、权利要求 15 所述的复溶溶液或权利要求 17 所述制品；

其中所述与 CTGF 相关的疾病优选为纤维性疾病、高血压、糖尿病、心肌梗死、关节炎、CTGF 相关细胞增殖性疾病、动脉粥样硬化、青光眼或癌症；

优选地，所述纤维性疾病选自：自发性肺纤维化、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、骨关节炎、硬皮病、慢性心力衰竭、肝硬化或肾纤维化；

优选地，所述癌症选自：急性淋巴母细胞性白血病、皮肤纤维瘤、乳腺癌、血管脂肪瘤、血管平滑肌瘤、结缔组织生成性癌症、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃肠道癌症或肝癌。