

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6696899号
(P6696899)

(45) 発行日 令和2年5月20日(2020.5.20)

(24) 登録日 令和2年4月27日(2020.4.27)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 Z N A
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 P
A61P 17/00 (2006.01)	A61P 17/00
A61P 11/00 (2006.01)	A61P 11/00

請求項の数 26 (全 130 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-534815 (P2016-534815)	(73) 特許権者 504456798 サノフイ S A N O F I フランス国、エフ - 75008・パリ、リ ユ・ラ・ボエティ・54 54 rue La Boëtie, F-75008 Paris, Franc e
(86) (22) 出願日	平成26年8月13日(2014.8.13)	
(65) 公表番号	特表2016-529255 (P2016-529255A)	
(43) 公表日	平成28年9月23日(2016.9.23)	
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/050896	
(87) 国際公開番号	W02015/023752	
(87) 国際公開日	平成27年2月19日(2015.2.19)	
審査請求日	平成29年7月31日(2017.7.31)	
(31) 優先権主張番号	61/865,451	(74) 代理人 100127926
(32) 優先日	平成25年8月13日(2013.8.13)	弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74) 代理人 100140132 弁理士 竹林 則幸
(31) 優先権主張番号	14305757.8	
(32) 優先日	平成26年5月22日(2014.5.22)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧洲特許庁(EP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1 (PAI-1) に対する抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域を含む、重鎖可変領域；並びに

(b) 配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、軽鎖可変領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【請求項2】

(a) 配列番号86を含む重鎖可変領域、並びに

(b) 配列番号93を含む軽鎖可変領域

を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

10

【請求項3】

(a) 請求項2に記載の抗体の重鎖可変領域と少なくとも95%同一であって、配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域を含む、重鎖可変領域、及び

(b) 請求項2に記載の抗体の軽鎖可変領域と少なくとも95%同一であって、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号36又は配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、軽鎖可変領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【請求項4】

20

(a) 配列番号 3 4 を含む重鎖 C D R 1 領域、配列番号 3 3 を含む重鎖 C D R 2 領域、及び配列番号 3 2 を含む重鎖 C D R 3 領域を含む、重鎖可変領域；並びに

(b) 配列番号 3 7 を含む軽鎖 C D R 1 領域、配列番号 3 6 を含む軽鎖 C D R 2 領域、及び配列番号 3 5 を含む軽鎖 C D R 3 領域を含む、軽鎖可変領域を含む、P A I - 1 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 5】

重鎖可変領域が配列番号 6 を含み、かつ軽鎖可変領域が配列番号 7 を含む、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

(a) 配列番号 8 2 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 1 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(b) 配列番号 8 3 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 2 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(c) 配列番号 8 4 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 3 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(d) 配列番号 8 5 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 1 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(e) 配列番号 8 5 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 3 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(f) 配列番号 8 6 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 4 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(g) 配列番号 8 7 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 5 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(h) 配列番号 8 8 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 6 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(i) 配列番号 8 9 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 7 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(j) 配列番号 9 0 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 8 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(k) 配列番号 8 6 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 5 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；

(l) 配列番号 8 9 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 3 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント；又は

(m) 配列番号 8 9 を含む重鎖可変領域を有する重鎖、及び配列番号 9 5 を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくは当該重鎖及び当該軽鎖により形成される抗原結合領域を含む抗原結合フラグメント

を含む、ヒト P A I - 1 に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 7】

10

20

30

40

50

それを必要とする被験体に、薬学的有効量の請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の P A I - 1 抗体を、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、プラスミン生成を回復させるための薬剤。

【請求項 8】

増加したレベルの線維化組織を含む状態を処置する、請求項 7 に記載の薬剤。

【請求項 9】

状態が、線維症、皮膚線維症、全身性硬化症、肺線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、慢性肺疾患、肝線維症、腎線維症、慢性腎臓病、血栓症、静脈及び動脈血栓症、深部静脈血栓症、末梢肢虚血、播種性血管内凝固血栓症、血栓溶解を伴うか若しくは伴わない急性虚血発作、又はステント再狭窄である、請求項 8 に記載の薬剤。

10

【請求項 10】

P A I - 1 抗体が、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、請求項 7、8 又は 9 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 11】

増加したレベルの P A I - 1 又は P A I - 1 に対する増加した感受性に起因する状態を処置するための医薬の製造のための、薬学的有効量の請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の P A I - 1 抗体の使用であって、患者に経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、上記使用。

【請求項 12】

P A I - 1 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体であって、以下の：

20

配列番号 8 8 又は 8 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であり、そして配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、重鎖可変領域；並びに

配列番号 9 1、9 3、9 4、9 5、9 6 又は 9 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であり、そして配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 6 又は配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、軽鎖可変領域；

を含む、上記単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 13】

P A I - 1 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体であって、以下の：

30

配列番号 8 8 又は 8 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であり、そして配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、重鎖可変領域；並びに

配列番号 9 1、9 3、9 4、9 5、9 6 又は 9 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であり、そして配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 6 又は配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、軽鎖可変領域；

を含む、上記単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 14】

P A I - 1 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体であって、以下の：

40

配列番号 8 8 又は 8 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 6 % 同一であり、そして配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、重鎖可変領域；並びに

配列番号 9 6 又は 9 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 6 % 同一であり、そして配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 6 又は配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、軽鎖可変領域；

を含む、上記単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 15】

P A I - 1 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体であって、以下の：

50

配列番号 8 8 又は 8 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；並びに配列番号 9 6 又は 9 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 6 % 同一であり、そして配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 6 又は配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、軽鎖可変領域；
を含む、上記単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 1 6】

重鎖可変領域は配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含み、並びに、軽鎖可変領域は配列番号 9 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 6 % 同一であり、そして配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 3 6 又は配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含む C D R 2 領域、及び配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R 3 領域を含む、請求項 1 5 に記載の単離されたモノクローナル抗体。 10

【請求項 1 7】

請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体の薬学的有効量の、それを必要とする患者のプラスミン生成を回復するための医薬の製造のための使用。

【請求項 1 8】

医薬は、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することができる、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 1 9】

医薬は、増加したレベルの線維化組織を含む状態を処置する、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 2 0】

状態は、線維症、全身性硬化症、間質性肺疾患、慢性肺疾患、慢性腎臓病、末梢肢虚血、血栓溶解を伴うか若しくは伴わない急性虚血発作、又はステント再狭窄である、請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 2 1】

医薬は、皮膚線維症、肺線維症、特発性肺線維症、肝線維症、又は腎線維症を含む状態を処置する、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

医薬は、静脈血栓症及び動脈血栓症、深部静脈血栓症、又は播種性血管内凝固血栓症を含む状態を処置する、請求項 2 0 に記載の使用。 30

【請求項 2 3】

請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体を含む、容器。

【請求項 2 4】

容器は、充填済みシリンジ、バイアル、又は自動注射器である、請求項 2 3 に記載の容器。

【請求項 2 5】

請求項 2 3 又は 2 4 に記載の容器、及び、単離されたモノクローナル抗体の投与及び/又は使用のためのラベル又は指示書を含む、キット。 40

【請求項 2 6】

プラスミン生成を回復するための、又は、増加したレベルの線維化組織、線維症、全身性硬化症、間質性肺疾患、慢性肺疾患、慢性腎臓病、末梢肢虚血、血栓溶解を伴うか若しくは伴わない急性虚血発作、ステント再狭窄、皮膚線維症、肺線維症、特発性肺線維症、肝線維症、腎線維症、静脈血栓症及び動脈血栓症、深部静脈血栓症、若しくは播種性血管内凝固血栓症を処置するための医薬を製造するための、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体の薬学的有効量の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮出願第61/865,451号（2013年8月13日出願）、及び欧州特許出願第14305757.8号（2014年5月22日出願）（これらはそれら全体として参照により本明細書に加入される）に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

背景

プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1型(PAI-1)は、プラスミン生成に関する鍵となるセリンプロテアーゼである組織型プラスミノーゲン活性化因子(tPA)及びウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子(uPA)の主要阻害剤である。PAI-1は、血管コンパートメントにおけるプラスミノーゲン活性化を阻害することにより線維素溶解を調節する。線維素溶解は、凝固カスケードの活性化により形成されるフィブリン血栓を分解するための緊密に協調したプロセスである。凝固/線維素溶解バランスの調節不全は、出血又は血栓性疾患のような異常な止血事象をもたらす。PAI-1はまた、受容体に結合したプラスミノーゲンがウロキナーゼ受容体(uPAR)に結合したウロキナーゼにより主に活性化される細胞周囲コンパートメント（血管内及び組織の）におけるプラスミノーゲン活性化の鍵となる調節因子である。細胞周囲タンパク質分解を阻害することにより、PAI-1は、細胞外マトリックス(ECM)分解、増殖因子活性化及びECMからの放出、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)活性化並びに細胞アポトーシスのような多数の細胞昨日を調節する。近年、PAI-1のプロテアーゼ非依存性効果が、(ビトロネクチン、ヘパリン、グリコサミノグリカンのような)補因子、uPAR-ウロキナーゼ複合体又は細胞受容体(LRP:低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質)又は接着/脱接着、遊走、増殖及び細胞内生物活性のような細胞機能に影響を及ぼすインテグリンとのその相互作用により同定された。これらの細胞機構及び抗線維素溶解効果により、PAI-1の病原性の役割が、腫瘍成長及び転移、線維症、急性心筋梗塞並びにアテローム性動脈硬化症、肥満及び糖尿病のような代謝障害において確立されてきた。

【0003】

ヒトSERPINE1(PAI-1)遺伝子は、第7染色体に局在化し、8つのインtron及び9つのエクソンからなり、そして12,169bのサイズを有する(非特許文献1)。PAI-1は、SERPIN(セリンプロテアーゼ阻害剤)スーパーファミリーからの約50kDa(379アミノ酸)の単鎖糖タンパク質であり、これは活性コンホメーションで合成されるがビトロネクチン(Vn)が存在しない場合は自発的に潜在性になる。PAI-1の主要補因子であるビトロネクチンは、表面上に露出された約20個のアミノ酸である反応性中心ループ(RCL)を有する活性コンホメーションを安定化させる。PAI-1の2つの主要な標的(tPA及びuPA)の阻害の機構は自殺阻害である。PAI-1のRCL領域は、ペイトペプチド結合(R346-M347、P1-P'1とも呼ばれる)を有し、これはこのセリンプロテアーゼについての切断部位を有する。tPA又はuPAとのミカエリス複合体を最初に形成し、次いで触媒三残基はペイトペプチド結合と反応してアシル-酵素複合体を形成し、これがP1-P'1ペプチド結合の切断後に強いコンホメーション変化を誘導する。コンホメーション変化は、プロテアーゼはアシル酵素としてPAI-1と共有結合したまま、切断されたRCLの-ストランドへの挿入を生じる。非生理的環境下で、このアシル-酵素複合体の加水分解は、切断されたPAI-1及び遊離活性プロテアーゼの放出を誘導し得る(非特許文献2)。

【0004】

PAI-1は、非常に変動するレベル(nM範囲)でかつt-PA又はuPA濃度よりも過剰に血中に循環する。PAI-1は構造的柔軟性を示し、そして3つのコンホメーションのうちの1つで見出され得る:(1)潜在(latent)コンホメーション、(2)活性コンホメーション、又は(3)基質コンホメーション(図1を参照のこと)。PAI-1は、潜在性移行(latency transition)を1.5~3倍減少させるビトロネクチンとの非共有結合複合体(Kd約1nM)として主に見出される。ビトロネクチンに対する潜在的か、切断されたか又は複合体化したPAI-1の親和性は

10

20

30

40

50

有意に減少される。マトリックス結合ビトロネクチンもまた、PAI-1とともに細胞周囲の空間に局在化する。内皮細胞、単球、マクロファージ及び血管平滑筋細胞はこのPAI-1を合成し、次いでこれが血小板(颗粒で)により潜在形態で大量に貯蔵され得る。PAI-1は、溶液中でtPA及びuPAの速く特異的な阻害剤(二次速度定数 $10^6 \sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$ を有する)であるが、フィブリン又はそれらの細胞受容体のいずれかに結合したプロテアーゼに対して不活性である。トロンビン、プラスミン、活性化プロテインCのような他のプロテアーゼもまたPAI-1により阻害されるが効率はより低い。

【 0 0 0 5 】

ヒトPAI-1のいくつかの3D構造が、1992年に最初の1つが記載されてから(非特許文献3)、潜在コンホメーションで解析されている。これらの3D構造としては、基質でのPAI-1の変異体形態(非特許文献4)、安定化された活性コンホメーション(非特許文献5)、ビトロネクチン-ソマトメジンBドメインに複合体化したPAI(非特許文献6)又はRCLループからの阻害ペプチドと複合体化したPAI(非特許文献7)が挙げられる。より最近には、潜在コンホメーションのマウスPAI-1構造が、Dewildeら(非特許文献8)により解明され、そしてRCL位置におけるヒトPAI-1との差異、ゲート領域及び-ヘリックスAの位置を明らかにした。PAI-1における構造/機能の関係は、この多機能セルピンの様々な活性に関与するドメインの位置を特定するために600より多い変異体タンパク質を使用することにより調べられた(非特許文献9による概説)。

【 0 0 0 6 】

PAI-1は、肝細胞、脂肪細胞、メサンギウム細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞、及び上皮細胞を含むほとんど全ての細胞型により合成され得るので、その発現は、生理的(例えば、血漿PAI-1レベルの概日変動)及び病理的条件(例えば、肥満、代謝症候群、インスリン抵抗性、感染、炎症性疾患、癌)下で大いに変動する。PAI-1は急性期タンパク質と考えられている。PAI-1 mRNA発現の転写調節は、いくつかのサイトカイン及び成長因子(例えば、TGF β 、TNF α 、EGF、FGF、インスリン、アンギオテンシンII及びIV)、ホルモン(例えば、アルドステロン、グルココルチコイド、PMA、高グルコース)並びにストレス因子(例えば、低酸素、反応性酸素種、リポ多糖類)により誘導される。

【 0 0 0 7 】

さらに、PAI-1遺伝子のプロモーター(位置-675)における多型は発現レベルに影響を及ぼす。4G対立遺伝子はPAI-1レベルを増加させ、そして4G/4G変異体(集団の約25%において発生する)は、5G/5G(25%発生及び4G/5G 50%発生)と比較して血漿PAI-1レベルの約25%の増加を誘導する。4G/4G多型は、心筋梗塞(非特許文献10)、特定の型の肺線維症(特発性間質性肺炎)(非特許文献11)に関連付けられており、そして4G/4G遺伝子型ドナー群は、間質性線維症及び尿細管萎縮に起因する移植腎喪失についての独立した危険因子である(非特許文献12)。

【 0 0 0 8 】

いくつかの病原性の役割が、動脈血栓症及び静脈血栓症、急性心筋梗塞、及びアテローム性動脈硬化症のような血栓性疾患においてPAI-1に起因すると考えられてきた。インスリン抵抗性症候群及び肥満のような代謝障害へのその関与はよく認識されている。PAI-1はいくつかの器官の線維化促進(profibrotic)因子としても知られており、線維性組織において過剰発現されることが示されている(すなわち、肝臓、肺、腎臓、心臓、腹部癒着、皮膚:瘢痕又は強皮症)(非特許文献13により概説される)。PAI-1ノックアウト(KO)マウスは、肝臓(胆管結紮又は生体異物)、腎臓(一側尿管閉塞モデル(UUO))、肺(ブレオマイシン吸入)のような様々なモデルにおいて線維症から保護されるが(非特許文献14;非特許文献15;非特許文献16)、一方で心臓においてこの欠失は誘導された線維症から保護されるが(非特許文献17)、年齢依存性心選択性線維症になりやすい(非特許文献18)。siRNAによるPAI-1発現の下方調節(非特許文献19)又は化学化合物による阻害(非特許文献20;非特許文献21)は、肺線維症を減少させると報告されたが、一方で野生型のPAI-1過剰発現(非特許文献22)又はビトロネクチン結合のみを保持するがtPA阻害剤機能を保持しないPAI-1変異体は肺線維症を増悪させる(非特許文献23)。

10

20

30

40

50

【0009】

胆管結紮(BDL)肝線維症は、PAI-1を中和する抗体により減弱されるが(特許文献1)、一方でsiRNAにより下方調節はBDL及び生体異物誘導肝線維症を減弱させる(非特許文献24)。PAI-1 KOマウスは、BDLにおいて胆汁うっ滯性誘導肝損傷及び線維症から(非特許文献25;非特許文献26;非特許文献27)、そしてアンジオテンシンII誘導肝線維症(非特許文献28)から保護された。

【0010】

PAI-1 KOマウスは、UUOモデル(非特許文献29)において、糖尿病性腎症において(非特許文献30)及びアンジオテンシンII誘導腎症において(非特許文献31;概説については、非特許文献32及び非特許文献33を参照のこと)腎線維症から保護される。対照的に、PAI-1過剰発現マウスは、より重症の線維症及びUUO後の増加したマクロファージ動員を示す(非特許文献34;非特許文献35)。非阻害性(Non-inhibitory)PAI-1変異体(PAI-1R)は、ラットにおける実験的糸球体腎炎(thy1)において、尿タンパク質発現及び糸球体マトリックス蓄積を減少させることにより線維症の発生からマウスを保護することが示された(非特許文献36)。PAI-1をブロックするペプチドは、コラーゲン3、4及びフィプロネクチン蓄積をUUOマウスにおいて阻害する(非特許文献37)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第7,771,720号

20

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Klinger, K.W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8548, 1987

【非特許文献2】Blouse et al., Biochemistry, 48:1723, 2009

【非特許文献3】Mottonen et al., Nature 355:270, 1992

【非特許文献4】Aertgeerts et al., Proteins 23:118, 1995

【非特許文献5】Sharp et al., Structure 7:111, 1999

【非特許文献6】Zhou et al., Nat. Struct. Biol. 10:541, 2003

【非特許文献7】Xue et al., Structure 6:627, 1998

【非特許文献8】Dewilde et al., J Struct. Biol. 171:95, 2010

30

【非特許文献9】De Taeye et al., Thromb. Haemost. 92:898, 2004

【非特許文献10】Dawson et al., Arterioscler Thromb. 11:183, 1991

【非特許文献11】Kim et al., Mol Med. 9:52, 2003

【非特許文献12】Rerolle et al., Nephrol. Dial. Transplant 23:3325, 2008

【非特許文献13】Ghosh and Vaughan, J. Cell Physiol. 227:493, 2012

【非特許文献14】Bauman et al., J. Clin. Invest. 120:1950, 2010

【非特許文献15】Hattori et al., Am. J. Pathol. 164:1091, 2004

【非特許文献16】Chuang-Tsai et al., Am. J. Pathol. 163:445, 2003

【非特許文献17】Takeshita et al., Am. J. Pathol. 164:449, 2004

【非特許文献18】Moriwaki et al., Cric. Res. 95:637, 2004

40

【非特許文献19】Senoo et al., Thorax 65:334, 2010

【非特許文献20】Izuhara et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28:672, 2008

【非特許文献21】Huang et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 46:87, 2012

【非特許文献22】Eitzman et al., J. Clin. Invest. 97:232, 1996

【非特許文献23】Courey et al., Blood 118:2313, 2011

【非特許文献24】Hu et al., J. Hepatol. 51:102, 2009

【非特許文献25】Bergheim et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:592, 2006

【非特許文献26】Wang et al., FEBS Lett. 581:3098, 2007

【非特許文献27】Wang et al., Hepatology 42:1099, 2005

【非特許文献28】Beier et al., Arch. Bioch. Biophys. 510:19, 2011

50

- 【非特許文献 29】Oda et al., Kidney Int. 60, 587, 2001
【非特許文献 30】Nicholas et al., Kidney Int. 67:1297, 2005
【非特許文献 31】Knier et al., J. Hypertens. 29:1602, 2011
【非特許文献 32】Ma et al. Frontiers Biosci. 14:2028, 2009
【非特許文献 33】Eddy A.A. Thromb. Haemost. 101:656, 2009
【非特許文献 34】Matsuo et al., Kidney Int. 67: 2221, 2005
【非特許文献 35】Bergheim et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:592, 2006
【非特許文献 36】Huang et al., Kidney Int. 70:515, 2006
【非特許文献 37】Gonzalez et al., Exp. Biol. Med. 234:1511, 2009

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

多数の病理の標的としてのPAI-1は、最近の20年間、その活性を阻害するか又はその発現を調節しようとする集中した研究の焦点であった。化学化合物(Suzuki et al., Expert Opin. Investig. Drugs 20:255, 2011)、モノクローナル抗体(Gils and Declerk, Thromb Haemost; 91:425, 2004)、ペプチド、変異体(Cale and Lawrence, Curr. Drug Targets 8:971, 2007)、siRNA又はアンチセンスRNAがその様々な機能を阻害するか又はその発現を調節するために設計されてきた。しかし、集中した研究にもかかわらず、PAI-1の治療的に有効なモジュレーターを開発する問題はなお解決されないままである。従って、PAI-1媒介ヒト病理の処置における使用のための、PAI-1活性を阻害する新規な薬剤の必要性が当該分野において存在する。

20

【課題を解決するための手段】

【0014】

開示の要旨

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで抗体は重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号6のCDR1(配列番号34)、CDR2(配列番号33)、及びCDR3(配列番号32)を含む]、並びに軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号7のCDR1(配列番号37)、CDR2(配列番号36)、及びCDR3(配列番号35)を含む]を含む。さらなる局面において、重鎖は、配列番号6を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号7を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号6と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号7と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。全ての同一性%近似値は、最小同一性%を示し；記載される値よりも高い同一性%もまた本開示に包含される。

30

【0015】

別の局面において、(a) 重鎖フレームワーク領域、配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域；並びに(b) 軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号36を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号6の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号7のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

40

【0016】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書に開示され、ここで抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号2のCDR1(配列番号22)、CDR2(配列番号21)、及びCDR3(配列番号20)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号3のCDR1(配列番号25)、CDR2(配列番号24)、及びCDR3(配列番号23)を含む]を含む。さらなる局面において

50

て、重鎖は、配列番号2を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号3を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号2と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号3と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 1 7 】

さらなる局面において、(a) 重鎖フレームワーク領域、配列番号22を含む重鎖CDR1領域、配列番号21を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号20を含む重鎖CDR3領域;並びに(b) 軽鎖フレームワーク領域、配列番号25を含む軽鎖CDR1領域、配列番号24を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号23を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号26の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号3のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。10

【 0 0 1 8 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示され、ここで抗体は重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号4のCDR1(配列番号28)、CDR2(配列番号27)、及びCDR3(配列番号26)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号5のCDR1(配列番号31)、CDR2(配列番号30)、及びCDR3(配列番号29)を含む]を含む。さらなる局面において、重鎖は、配列番号4を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号5を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号4と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号5と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。20

【 0 0 1 9 】

さらなる局面において、(a) 重鎖フレームワーク領域、配列番号28を含む重鎖CDR1領域、配列番号27を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号26を含む重鎖CDR3領域;並びに(b) 軽鎖フレームワーク領域、配列番号31を含む軽鎖CDR1領域、配列番号30を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号29を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の局面において、抗体重鎖は配列番号4の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号5のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。30

【 0 0 2 0 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号8のCDR1(配列番号40)、CDR2(配列番号39)、及びCDR3(配列番号38)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号9のCDR1(配列番号43)、CDR2(配列番号42)、及びCDR3(配列番号41)を含む]を含む。さらなる局面において、重鎖は、配列番号8を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号9を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号8と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号9と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。40

【 0 0 2 1 】

別の局面において、(a) 重鎖フレームワーク領域、配列番号40を含む重鎖CDR1領域、配列番号39を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号38を含む重鎖CDR3領域;並びに(b) 軽鎖フレームワーク領域、配列番号43を含む軽鎖CDR1領域、配列番号42を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号41を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号8の重鎖50

フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号9のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【 0 0 2 2 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号10のCDR1(配列番号52)、CDR2(配列番号51)、及びCDR3(配列番号50)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号11のCDR1(配列番号55)、CDR2(配列番号54)、及びCDR3(配列番号53)を含む]を含む。さらなる局面において、重鎖は、配列番号10を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号11を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号10と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は配列番号11と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 2 3 】

さらなる局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号52を含む重鎖CDR1領域、配列番号51を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号50を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号55を含む軽鎖CDR1領域、配列番号54を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号53を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書で開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号10の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号11のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【 0 0 2 4 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号12のCDR1(配列番号58)、CDR2(配列番号57)、及びCDR3(配列番号56)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号13のCDR1(配列番号61)、CDR2(配列番号60)、及びCDR3(配列番号59)を含む]を含む。さらなる局面において、重鎖は、配列番号12を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号13を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号12と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号13と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 2 5 】

別の局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号58を含む重鎖CDR1領域、配列番号57を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号56を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号61を含む軽鎖CDR1領域、配列番号60を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号59を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号12の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号13のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【 0 0 2 6 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号14のCDR1(配列番号64)、CDR2(配列番号63)、及びCDR3(配列番号62)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号15のCDR1(配列番号67)、CDR2(配列番号66)、及びCDR3(配列番号65)を含む]を含む。さらなる局

10

20

30

40

50

面において、重鎖は、配列番号14を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号15を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号14と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号15と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 2 7 】

さらなる局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号64を含む重鎖CDR1領域、配列番号63を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号62を含む重鎖CDR3領域;並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号67を含む軽鎖CDR1領域、配列番号66を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号65を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号14の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号15のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【 0 0 2 8 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号16のCDR1(配列番号70)、CDR2(配列番号69)、及びCDR3(配列番号68)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号17のCDR1(配列番号73)、CDR2(配列番号72)、及びCDR3(配列番号71)を含む]を含む。

【 0 0 2 9 】

さらなる局面において、重鎖は、配列番号16を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号17を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号16と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号17と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 3 0 】

さらなる局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号70を含む重鎖CDR1領域、配列番号69を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号68を含む重鎖CDR3領域;並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号73を含む軽鎖CDR1領域、配列番号72を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号71を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号16の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号17のフレームワーク領域99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【 0 0 3 1 】

一局面において、ヒトプラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号80のCDR1(配列番号46)、CDR2(配列番号45)、及びCDR3(配列番号44)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号81のCDR1(配列番号49)、CDR2(配列番号48)、及びCDR3(配列番号47)を含む]を含む。

【 0 0 3 2 】

さらなる局面において、重鎖は、配列番号80を含む重鎖可変領域を含み、かつ軽鎖は、配列番号81を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号80と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号81と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 3 3 】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号46を含む重鎖CDR1領域、配列

10

20

30

40

50

番号45を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号44を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号49を含む軽鎖CDR1領域、配列番号48を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号47を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号80の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号81のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【0034】

別の局面において、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤1型(PAI-1)に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号18のCDR1(配列番号76)、CDR2(配列番号75)、及びCDR3(配列番号74)を含む]、及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号19のCDR1(配列番号79)、CDR2(配列番号78)、及びCDR3(配列番号77)を含む]を含む。さらなる局面において、重鎖は、重鎖配列番号18を含む可変領域を含み、軽鎖は、配列番号19を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる局面において、重鎖可変領域は、配列番号18と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつ軽鎖可変領域は、配列番号19と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【0035】

(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号76を含む重鎖CDR1領域、配列番号75を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号74を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号79を含む軽鎖CDR1領域、配列番号78を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号77を含む軽鎖CDR3領域を含む、単離されたモノクローナル抗体。特定の局面において、抗体重鎖は、配列番号18の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ抗体軽鎖は、配列番号19のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。

【0036】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号33を含む重鎖CDR1領域、配列番号146を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

【0037】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号147を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号36を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

【0038】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号147を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

【0039】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号146を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域；並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

10

20

30

40

50

ル抗体が本明細書において開示される。

【0040】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域;並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

【0041】

さらなる局面において、重鎖可変領域、[ここで重鎖可変領域は、配列番号6のCDR1(配列番号34)、CDR2(配列番号33)、及びCDR3(配列番号32)を含む]、及び軽鎖可変領域、[ここで軽鎖可変領域は、配列番号7のCDR1(配列番号37)、CDR2(配列番号36)、及びCDR3(配列番号35)を含む]を含む単離されたモノクローナル抗体とPAI-1上の本質的に同じエピトープに結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

【0042】

特定の局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号76を含む重鎖CDR1領域、配列番号75を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号74を含む重鎖CDR3領域;並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号79を含む軽鎖CDR1領域、配列番号78を含む軽鎖CDR2領域、並びに配列番号77を含む軽鎖CDR3領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。

【0043】

一局面において、ヒトPAI-1に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は:(a)配列番号82を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号91を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(b)配列番号83を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号92を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(c)配列番号84を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(d)配列番号85を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号91を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(e)配列番号85重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(f)配列番号86を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号94を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(g)配列番号87を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号95を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(h)配列番号88を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号96を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(i)配列番号89を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号97を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(j)配列番号90を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号98を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(k)配列番号86を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(l)配列番号86を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号95を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;(m)配列番号89を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント;又は(n)配列番号89を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号95を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメントを含む。さらなる局面において、ヒト化重鎖可変領域は、以前に開示されたヒト重鎖可

10

20

30

40

50

変領域のいずれかと99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつヒト化軽鎖可変領域は、以前に開示されたヒト軽鎖可変領域のいずれかと99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。

【 0 0 4 4 】

一局面において、(a)重鎖フレームワーク領域、及び配列番号86を含む重鎖可変領域、並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の局面において、単離されたモノクローナル重鎖は、配列番号86の重鎖フレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ単離されたモノクローナル抗体軽鎖は、配列番号93のフレームワーク領域と99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。特定の他の局面において、単離されたモノクローナル抗体重鎖は、配列番号86の重鎖フレームワーク領域と95%同一である重鎖フレームワーク領域を含み、かつ単離されたモノクローナル抗体軽鎖は、配列番号93のフレームワーク領域と95%同一である軽鎖フレームワーク領域を含む。
10

【 0 0 4 5 】

別の局面において、ヒトPAI-1に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体が本明細書で開示され、ここで該抗体は、配列番号154を含む重鎖可変領域を有する重鎖、又はその抗原結合フラグメント；及び配列番号153を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、又はその抗原結合フラグメントを含む。別の局面において、ヒトPAI-1に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、配列番号155を含む重鎖可変領域を有する重鎖、又はその抗原結合フラグメント、及び配列番号153を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、又はその抗原結合フラグメントを含む。さらなる局面において、ヒト化重鎖可変領域は、以前に開示されたヒト重鎖可変領域のいずれかと99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり、かつヒト化軽鎖可変領域は、以前に開示されたヒト軽鎖可変領域のいずれかと99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一である。
20

【 0 0 4 6 】

別の局面において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで該抗体は、配列番号158を含むポリペプチドに結合する。別の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、配列番号158を含むポリペプチドのフラグメントに結合する。さらに別の実施態様において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体は、配列番号156及び／又は配列番号158を含むポリペプチドに結合する。別の実施態様において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体は、配列番号156、配列番号158、及び／又は配列番号157を含むポリペプチドに結合する。なお別の実施態様において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体は、配列番号1の残基160、262、296-297、300～307、及び／又は310～316に対する特異的結合親和性を含む。特定の実施態様において、本明細書に開示される単離されたモノクローナル抗体は、配列番号1の少なくとも残基311、312、及び313(D-Q-E)と相互作用する。特定の実施態様において、抗体により結合されるPAI-1はヒトPAI-1である。他の実施態様において、抗体により結合されるPAI-1はヒトPAI-1の活性形態である。
30
40

【 0 0 4 7 】

他の実施態様において、本明細書に開示されるPAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体は、配列番号161を含むポリペプチドに結合する。なお他の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、配列番号159及び／又は配列番号161を含むポリペプチドに結合する。なお他の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、配列番号159、配列番号160、及び／又は配列番号161を含むポリペプチドに結合する。なお別の実施態様において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体は、カニクイザル(cyno)-PAI-1(配列番号162)の残基44～64及び／又は残基307～321に対する特異的結合親和性を含む。特定の実施態様において、抗体により結合されるPAI-1はカ
50

ニクイザル-PAI-1である。他の実施態様において、抗体により結合されるPAI-1は、カニクイザル-PAI-1の潜在形態である。

【0048】

さらなる局面において、PAI-1への開示された抗体のいずれかの結合を競合的に阻害する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。一実施態様において、本明細書において開示される単離されたモノクローナル抗体のうちのいずれかと結合について競合するか、かつ/又は競合的に阻害する、単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。特定の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、競合するか又はヒトPAI-1への結合を競合的に阻害する。特定の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、競合するか又は配列番号156、配列番号157、及び/若しくは配列番号158を含むポリペプチドへの結合を競合的に阻害する。別の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、競合するか、又は配列番号159、配列番号160、及び/若しくは配列番号161を含むポリペプチドへの結合を競合的に阻害する。一実施態様において、単離された抗体は、配列番号156、157、及び/又は158を含むポリペプチドへの結合について、(a)重鎖フレームワーク領域、配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域;並びに(b)軽鎖フレームワーク領域、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む単離されたモノクローナル抗体と競合する。10

【0049】

別の局面において、本明細書に開示される単離されたモノクローナル抗体のいずれかをコードするヌクレオチドが本明細書において開示される。20

【0050】

一局面において、PAI-1の増加した発現又はPAI-1に対する増加した感受性に起因する状態を処置する方法が本明細書で開示され、該方法は、患者又は他の被験体に、薬学的有効量のPAI-1抗体を、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む。

【0051】

一局面において、患者又はそれを必要とする他の被験体に、薬学的有効量のPAI-1抗体を、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、プラスミン生成を回復する方法が本明細書において開示される。本明細書に開示される非経口投与としては、静脈内、点滴、動脈内、腹腔内、筋内、皮下、直腸又は腔、静脈内、動脈内、皮下、及び筋内の非経口投与形態が挙げられる。いくつかの実施態様において、患者又は他の被験体への投与は、複数回投与を含む。別の局面において、プラスミン生成を回復させる方法は、増加したレベルの線維化組織を含む状態の治療的処置を促進する。いくつかの局面において、この状態は線維症を特徴とする。いくつかの局面において、状態は、線維症、皮膚線維症、全身性硬化症、肺線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、及び慢性肺疾患である。他の局面において、プラスミン生成は、肝線維症、慢性腎臓病を含む腎線維症、血栓症、静脈血栓症及び動脈血栓症、深部静脈血栓症、末梢肢虚血、播種性血管内凝固血栓症、血栓溶解を伴うか若しくは伴わない急性虚血発作、又はステント再狭窄の治療的処置を促進する。3040

【0052】

別の局面において、患者又は他の被験体に、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、PAI-1の増加した発現又はPAI-1に対する増加した感受性に起因する状態を処置するための医薬の製造のための、薬学的有効量のPAI-1抗体の使用が本明細書に開示される。

【0053】

一局面において、医薬は、増加したレベルの線維化組織を含む状態を処置するためのものである。いくつかの局面において、状態は線維症を特徴とする。いくつかの局面において、状態は、線維症、皮膚線維症、全身性硬化症、肺線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、及び慢性肺疾患である。他の局面において、医薬は、肝線維症、慢性腎臓病を含む50

腎線維症、血栓症、静脈血栓症及び動脈血栓症、深部静脈血栓症、末梢肢虚血、播種性血管内凝固血栓症、血栓溶解を伴うか若しくは伴わない急性虚血発作、又はステント再狭窄を含む状態を処置するためのものである。

【0054】

別の局面において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで抗体は肺線維症を阻害する。特定の実施態様において、抗体は、被験体の肺における線維症を阻害する。特定の実施態様において、抗体は、特発性肺線維症(IPF)を有する被験体の肺において線維症を阻害する。いくつかの実施態様において、本明細書において開示される単離されたモノクローナル抗体は、被験体においてフィブリン分解の増加を誘導する。特定の実施態様において、抗体は、被験体の血漿中のフィブリン分解を増加させる。いくつかの他の実施態様において、本明細書において開示される単離されたモノクローナル抗体は、被験体の肺におけるコラーゲン蓄積を阻害する。いくつかの実施態様において、被験体はIPFを有する。いくつかの他の実施態様において、本明細書において開示される単離されたモノクローナル抗体は、被験体の気管支肺胞洗浄液(BALF)中のD-ダイマー濃度を増加させる。いくつかの実施態様において、被験体はIPFを有する。いくつかの他の実施態様において、本明細書において開示される単離されたモノクローナル抗体は、PAI-1に特異的に結合し、ここで抗体は、被験体における線維症に起因した肺質量増加を阻害する。一実施態様において、被験体はIPFを有する。

10

【0055】

別の局面において、患者に経口的に、注射溶液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、PAI-1の増加した発現又は増加した感受性に起因する状態を処置するための医薬の製造のための、薬学的有効量のPAI-1抗体の使用が本明細書において開示され、ここで状態は特発性肺線維症である。

20

【0056】

別の局面において、その患者又は他の被験体に、薬学的有効量のPAI-1抗体を、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、プラスミン生成を回復する方法が本明細書において開示され、ここでプラスミン生成は、特発性肺線維症の治療的処置を促進する。

【0057】

別の局面において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで抗体は、被験体において線維素溶解活性を回復する。特定の実施態様において、抗体は、急性虚血発作を有する被験体において線維素溶解活性を回復する。急性虚血発作は、血栓溶解を伴っていても伴っていないなくてもよい。いくつかの実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は血餅溶解を回復する。特定の実施態様において、抗体はインビトロで血餅溶解を回復する。なお他の実施態様において、抗体はインビトロで約2nMのIC₅₀で血餅溶解を回復する。

30

【0058】

他の局面において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで抗体は、被験体におけるフィブリン分解(fibrin breakdown)を回復する。いくつかの実施態様において、被験体は急性虚血発作を有する。

40

【0059】

別の局面において、経口的に、注射溶液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に患者に投与する言を含む、PAI-1の増加した発現又はPAI-1に対する増加した感受性に起因する状態を処置するための医薬の製造のための、薬学的有効量のPAI-1抗体の使用が本明細書において開示され、ここで状態は血栓溶解を伴うか又は伴わない急性虚血発作である。

【0060】

別の局面において、患者又はそれを必要とする他の被験体に、薬学的有効量のPAI-1抗体を、経口的に、注射溶液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、プラスミン生成を回復する方法が本明細書において開示され、ここでプラスミン

50

生成は、血栓溶解を伴うか又は伴わない急性虚血発作の治療的処置を促進する。

【0061】

別の局面において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで抗体は、被験体において癒着 (adhesions) の形成を阻害する。いくつかの実施態様において、癒着形成は手術又は外傷の後である。いくつかの実施態様において、被験体における癒着形成は腹部である。他の実施態様において、癒着形成は、被験体の肩部、骨盤、心臓、脊椎、手、及び他の身体領域において発生する。

【0062】

別の局面において、経口的に、注射溶液剤により非経口的に、吸入により、局所的に患者に投与することを含む、PAI-1の増加した発現又はPAI-1に対する増加した感受性に起因する状態を処置又は予防するための医薬の製造のための、薬学的有効量のPAI-1抗体の使用が本明細書に開示され、ここで状態は腹部癒着形成である。

10

【0063】

別の局面において、患者又はそれを必要とする他の被験体に、薬学的有効量のPAI-1抗体を、経口的に、注射溶液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、プラスミン生成を回復する方法が本明細書において開示され、ここでプラスミン生成は、癒着形成の処置又は予防を促進する。いくつかの実施態様において、被験体における癒着形成は腹部である。

【0064】

別の局面において、PAI-1/ビトロネクチン複合体に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。別の局面において、PAI-1基質コンホーメーション (substrate conformation) を誘導することによりPAI-1活性を中和する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示される。一実施態様において、抗体は、プラスミン生成を回復するか又は回復する能力がある。別の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、フィブロネクチン分解を誘導するか又は誘導する能力がある。さらに別の実施態様において、単離されたモノクローナル抗体は、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) 活性化を誘導するか又は誘導する能力がある。

20

【0065】

別の局面において、本明細書に開示される単離されたモノクローナル抗体は、抗体フラグメントである。いくつかの実施態様において、抗体は単鎖Fv抗体である。他の実施態様において、重鎖及び軽鎖は、可動性のリンカーにより接続されて単鎖抗体を形成する。他の実施態様において、抗体はFab、Fab'、又は(Fab')₂抗体である。

30

【0066】

別の局面において、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が本明細書において開示され、ここで抗体は結晶化された抗体である。一実施態様において、モノクローナル抗体A44のFab' フラグメントを含む単離された結晶が本明細書において開示され、ここでFab' フラグメントは、軽鎖配列 配列番号7及び重鎖配列 配列番号6からなる。別の実施態様において、軽鎖配列 配列番号93及び重鎖配列 配列番号86を含むFab' フラグメントを含む単離された結晶が本明細書において開示される。一実施態様において、単離された結晶は、アシメトリックな単位セル寸法 a=105、b=152 及びc=298 を含む。一実施態様において、単離された結晶はP212121空間群に属する。別の実施態様において、単離された結晶は、x線回折の3.3 分解能を含む。一実施態様において、単離された結晶は、結晶化された抗体の生物学的活性を保持する。いくつかの実施態様において、単離された結晶は、結晶化された抗体の可溶性の対応するものよりもインビボでより大きな半減期を有する。

40

【0067】

一局面において、(a)PAI-1に特異的に結合する結晶化された抗体、及び(b)結晶を包埋又は封入する少なくとも1つの薬学的賦形剤を含む医薬組成物が本明細書において開示される。

【0068】

50

別の局面において、薬学的に許容しうる担体及び治療有効量の本明細書に開示される抗体のうちのいずれかを含む医薬組成物が本明細書において開示される。

【0069】

一局面において、PAI-1、又はそのフラグメント、及びビトロネクチンから構成される複合体を用いて哺乳動物を免疫することを含む、PAI-1に対する抗体を生成する方法が本明細書において開示される。

【0070】

別の局面において、tPA活性阻害剤としてのPAI-1の機能をブロックするその能力についてELISAでPAI-1抗体をスクリーニングする方法が本明細書において開示され、該方法は：(a)PAI-1をELISAプレートに結合させる工程；(b)ELISAプレートをPAI-1抗体とともにインキュベートする工程；(c)ELISAプレートをtPAとともにインキュベートする工程；(d)標識した抗tPA抗体とともにELISAプレートをインキュベートする工程；及び(e)標識された抗tPA抗体により発せられるOD₄₀₅を測定する工程を含み；ここでポジティブな記録(reading)は、PAI-1抗体がPAI-1に結合するがPAI-1とtPAとの間の共有結合の形成をブロックするということを示し、かつネガティブな記録は、PAI-1抗体がPAI-1とのtPAの相互作用をブロックすることを示す。

10

【0071】

別の局面において、ハイブリドーマをスクリーニングする方法が本明細書において開示される。特定の実施態様において、スクリーニングする方法は、抗マウス固定抗PAI-1抗体を使用する逆スクリーニング方法を含む。他の実施態様において、スクリーニング方法は、リガンドとして又は固定されたビトロネクチンに対して遊離PAI-1を使用する順方向(forward)スクリーニングアッセイを含む、又は(comprises or)。特定の実施態様において、この方法は、PAI-1/ビトロネクチン複合体に対する抗体の親和性を決定するため適用される。いくつかの実施態様において、この方法は：ビトロネクチンを表面に固定する工程；表面に固定されたビトロネクチンとPAI-1を接触させ、それにより複合体を形成する工程；複合体を含む表面を抗体と接触させる工程；複合体に結合した抗体を未結合の抗体と分離する工程；複合体に結合した抗体を検出し、そして複合体に結合した抗体のレベルを分析して、複合体に対する抗体の親和性を決定する工程を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0072】

30

【図1】図1は、PAI-1と、組織型プラスミノーゲン活性化因子(tPA)及びウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子(uPA)のセリンプロテアーゼとの間の機構の略図を示す。PAI-1は、構造的柔軟性を示し、そしてそれがビトロネクチン(Vn)に結合した場合に潜在コンホーメーション又は活性コンホーメーションで存在し得る。PAI-1のRCL領域は、セリンプロテアーゼによる切断部位であるペイトペプチド結合(P1-P1' とも呼ばれる)を保有する。tPA又はuPAとのミカエリス複合体が初めに形成し、次いで触媒三残基はペイトペプチド結合と反応してアシル-酵素複合体を形成し、これが、P1-P'1ペプチド結合の切断後に、強いコンホーメーション変化を誘導する。アシル酵素は、セリンプロテアーゼ(tPA)からの触媒三残基からのセリン残基(黒三角)とさらなる加水分解を受ける基質(黒丸)からのアミノ酸との間の共有結合により形成される不安定な複合体である。コンホーメーション変化は、プロテアーゼがPAI-1とアシル酵素として共有結合したままで、-ストランド中への切断されたRCLの挿入を引き起こす。非生理的環境下で、このアシル-酵素複合体の加水分解は、切断されたPAI-1及び遊離活性プロテアーゼの放出を誘導し得る。

40

【図2】図2は、実施例2に記載されるような結合ELISAにおける抗体滴定についての典型的な標準曲線を示す。抗体31C9、33B8及び33H1は、陽性対照であり、そしてIgG1は陰性対照としてのものであった。

【図3】図3は、実施例4に記載されるように、PAI-1のtPAとの相互作用をブロックする抗体を選択するための機能的ELISAについての表現曲線を示す。抗体33H1は陽性対照であり、IgG1は陰性対照であり、そしてA44を陽性抗体クローニングとして同定した。

【図4】図4は、実施例4に記載される発色アッセイにおけるA44及び市販の抗体(33B8及

50

び33H1)によるtPAの活性をブロックするヒトPAI-1の中和を示す。

【図5】図5は、異なる融合により產生された抗体の選択による、tPAの活性をブロックするヒトPAT-1の中和を示す(実施例4を参照のこと)。

【図6】図6は、ヒトPAI-1及びそのオルソログが同様の効力で発色アッセイにおいてヒトtPA活性をブロックするということを示す。

【図7】図7は、実施例4に記載される発色アッセイにおける、A44及び33B8(市販)抗体によるヒトtPAのブロッキング活性のカニクイザル(cyno)及びマウスPAI-1の中和を示す。

【図8】図8は、抗体33H8(PAI-1を活性コンホメーションから潜在コンホメーションへと変換する)、33H1(PAI-1を活性コンホメーションから基質コンホメーションへと変換する)及びA44がPAI-1のtPAとの相互作用をブロックする作用機序のSDS-Page分析を示す。レーン1:分子量標準;レーン2:PAI-1のみ;レーン3:tPAのみ;レーン4:tPAの存在下でのPAI-1;レーン5:33B8+PAI-1+tPA;レーン6:33H1+PAI-1+tPA;レーン7:A44+PAI-1+tPA;レーン8:mAbはアイソタイプ対照抗体である。

【図9】図9は、抗体33H8(PAI-1を活性コンホメーションから潜在コンホメーションへと変換する)、33H1(PAI-1を活性コンホメーションから基質コンホメーションへと変換する)並びに融合物C26、E16及びE21から生じた抗体がPAI-1のtPAとの相互作用をブロックする作用機序のSDS-Page分析を示す。レーン1:分子量標準;レーン2:PAI-1のみ;レーン3:tPAのみ;レーン4:tPAの存在下でのPAI-1;レーン5:33B8+PAI-1+tPA;レーン6:33H1+PAI-1+tPA;レーン7:C26+PAI-1+tPA;レーン8:E16+PAI-1+tPA;レーン9:E21+PAI-1+tPA;レーン10:mAbはアイソタイプ対照抗体である。

【図10】図10は、抗体33H8(PAI-1を活性コンホメーションから潜在コンホメーションへと変換する)、33H1(PAI-1を活性コンホメーションから基質コンホメーションへと変換する)並びに融合物A39、B109及びC45から生じた抗体がPAI-1のtPAとの相互作用をブロックする作用機序のSDS-Page分析を示す。レーン1:分子量標準;レーン2:PAI-1のみ;レーン3:tPAのみ;レーン4:tPAの存在下でのPAI-1;レーン5:33B8+PAI-1+tPA;レーン6:33H1+PAI-1+tPA;レーン7:A39+PAI-1+tPA;レーン8:B109+PAI-1+tPA;レーン9:C45+PAI-1+tPA;レーン10:mAbはアイソタイプ対照抗体である。

【図11】図11は、以下のマウス抗体の軽鎖の整列を示す:A105(配列番号3)、A39(配列番号5)、A44(配列番号7)、A71(配列番号9)、A75(配列番号81)、B109(配列番号11)、B28(配列番号13)、C45(配列番号15)、E16(配列番号17)、及びE21(配列番号19)。CDRは太字で強調されている。

【図12】図12は、以下のマウス抗体の重鎖の整列を示す:A105(配列番号2)、A39(配列番号4)、A44(配列番号6)、A71(配列番号8)、A75(配列番号80)、B109(配列番号10)、B28(配列番号12)、C45(配列番号14)、E16(配列番号16)、及びE21(配列番号18)。IMGTにより定義されるCDRは太字で強調されている。

【図13】図13は、マウスA44軽鎖(配列番号7)とvk1(配列番号101)及びv\lambda3(配列番号102)との整列を示す。

【図14】図14は、マウスA44重鎖(配列番号6)とvh2(配列番号103)及びvh4(配列番号104)との整列を示す。

【図15】図15は、全ての構築物が整列されたクローンA44ヒト化VLを示す。全ての整列された配列(配列番号91~98)は、表25において以下にさらに記載される。黒い枠はCDRドメインを表す。強調された残基は、整列ですぐ上の残基と配列が異なる。残基の番号付けはIMGTにより記載されるとおりである。

【図16】図16は、全ての構築物が整列されたクローンA44ヒト化VHを示す。全ての整列された配列(配列番号82~90)を表25において以下に更に記載する。黒い枠はCDRドメインを表す。強調された残基は、整列においてすぐ上の残基と配列が異なる。残基番号付けはIMGTにより記載されるとおりである。

【図17】図17は、PAI-1活性の阻害パーセントをmAb濃度の関数としてプロットし、そしてIC50をBiostat speedソフトウェアを使用してImaxを決定したことを示す。

【図18】図18は、均一性組み換え6-Hisタグ化Fab A44の精製を示す。

10

20

30

40

50

【図19】図19は、固定されたAPG抗体へのヒトPAI-1グリコシル化結合のシングルカイネティクス (single kinetic) 分析を使用したBiacore 2000を用いたSPR分析を示す。シングルサイクルカイネティクス (single-cycle kinetic) からのセンサーグラムを灰色で示す。適合モデルを黒色で示す。

【図20】図20は、ELISAによるUK-PAI-1複合体形成検出により決定した、APG、APGv2、及びAPGv4抗体によるヒト血漿PAI-1中和を示す。PAI-1活性の阻害パーセントを、APG、APGv2、又はAPGv4抗体の濃度の関数としてプロットした。

【図21】図21は、時間(分)の関数として340nmでの吸光度読み取りによる比濁法動力学的測定により検出した、tPA 1nM及びPAI-1 3nMの存在下でのA44V11(1、3又は10nM)によるヒト血漿血餅溶解の回復を示す。
10

【図22】図22は、時間(分)の関数として340nmでの吸光度により検出した、tPA 1nM及びPAI-1 3nMの存在下でのヒトIgG1陰性対照(1、3又は10nM)によるヒト血漿血餅溶解の回復の不在を示す。

【図23】図23は、様々な濃度でのA44V11又はヒトIgG1アイソタイプ陰性対照によるヒト血漿血餅溶解の回復を示す。

【図24】図24は、時間(分)の関数として340nmでの吸光度により検出した、tPA 1nM及びPAI-1 3nMの存在下での3nMのAPG、APGv2又はAPGv4によるヒト血漿血餅溶解の回復を示す。

【図25】図25は、様々な濃度でのAPG変異体2及び4によるヒト血漿血餅溶解の回復を示す。
20

【図26】図26は、50nMでのA44V11又はIgGアイソタイプ対照mAb及びTGF 5ng/mlによる処置後48時間でのヒトLL29筋線維芽細胞上清での免疫プロット抗PAI-1を示す。

【図27】図27は、PBS(対照)、プラスミノーゲン(Pg)、A44v11及びプラスミノーゲン(A+Pg)又は陰性のヒトIgG及びプラスミノーゲン(Neg+Pg)で48時間細胞処理した後のヒト初代肺線維芽細胞における一般的(generic) MMP活性を示す。

【図28】図28は、腹腔内(i.p.)投与による10mg/kgでのA44若しくはIgG1又はPBSでの4日目の処置の7日後及び9日後の時点のブレオマイシン処置マウスからの気管支肺胞洗浄液(BALF)中(A)及び肺溶解物(B)中のヒト活性PAI-1レベルを示す。ELISA(#HPAIKT Molecular Innovation)により決定された活性PAI-1。阻害のパーセンテージを、A44ブレオマイシン(bleo)とIgG bleoとの間の差異を、IgG bleoと未処置(PBS)マウス群との間の差異で割ることにより計算した。
30

【図29】図29は、ELISA(Asserachrom D-Di、Diagnostica Stago)により決定した、i.p.投与による10mg/kgのA44若しくはIgG1又はPBSを用いた4日目の処置の7日後及び9日後のブレオマイシン処置マウスからのBALF中のマウスD-ダイマーレベルを示す。IgGと比較したA44により誘導されたD-ダイマーの倍(Fold)増加が示される。

【図30】図30は、4日目から20日目まで3日ごとのPBS(ビヒクル)、IgG1又はA44 10mg/kgのi.p.投与後に食塩水又はブレオマイシン処置のいずれかの21日後のトランスジエニックヒト化マウスからの右肺質量を示す。

【図31】図31は、4日目から20日目まで3日ごとのPBS(ビヒクル)、IgG1又はA44 10mg/kgのi.p.投与後に食塩水又はブレオマイシン処置のいずれかの21日後のトランスジエニックヒト化マウスにおけるヒドロキシプロリン肺含有量を示す。
40

【図32】図32は、LPSチャレンジ(100ug/kg静脈内(iv))の24時間前にA44V11(A)mAb(n=5)又はIgG1アイソタイプ対照(B)(n=4)(5mg/kg腹腔内(ip))で処置されたサルからの血漿中の活性PAI-1レベルを示す。血液サンプルを、示された時点で採取し、そして活性PAI-1レベルをELISA (Molecular Innovationからの# HPAIKT)を使用して血漿中で決定した。

【図33】図33は、LPSチャレンジ(100ug/kg iv)の24時間前にA44V11(A)mAb (n=5)又はIgG1アイソタイプ対照(B)(n=4)(5mg/kg ip)により処置されたサルからの肝臓生検における活性PAI-1レベルを示す。肝臓生検を、麻酔されたサルにおいて示された時点に採取し、そして活性PAI-1レベルを、ELISA(Molecular Innovationからの#HPAIKT)を使用して溶解物中で決定した。
50

【図34】図34は、LPSチャレンジ(100ug/kg iv)の24時間前にA44V11(A)mAb(n=5)又はIgG1アイソタイプ対照(B)(n=4)(5mg/kg ip)により処置されたサルからの血漿中のD-ダイマーレベルを示す。血液サンプルを示された時点に採取し、そしてD-ダイマーレベルをELISAを使用して血漿中で測定した。

【図35】図35は、LPSチャレンジ(100ug/kg iv)の24時間前にA44V11(A)mAb(n=5)により又はIgG1アイソタイプ対照(B)(n=4)(5mg/kg ip)で処置されたサルからの血漿中のプラスミン2抗プラスミン(PAP)複合体レベルを示す。血液サンプルを示された時点で採取し、そしてPAPレベルを、ELISA(Diagnostica Stagoからの# Asserachrom PAP)を使用して血漿中で決定した。

【図36】図36は、腹腔内液(IPF)及び子宮角溶解物中の活性PAI-1のレベルを示す。腹腔内液(A)及び子宮角溶解物(B)中の活性PAI-1レベル。6時間及び7日目の時点で、活性PAI-1レベルは、アイソタイプ対照抗体で処置された動物と比較して、A44V11抗体で処置された動物において腹腔内液(IPF)及び子宮角(UH)溶解物の両方でより低く、72時間の時点では差異は観測されなかった。(* スチュードントt検定により計算してp<0.001) 10

【図37】図37は、同種(homogeneity)組み換え6-Hisタグ化(tagged)Fab A44の精製の別の例を示す。

【図38】図38は、ヒトwt PAI-1タンパク質と複合体化した同種組み換え6-Hisタグ化Fab A44の精製を示す。

【図39】図39(a)は、Fab A44/PAI-1複合体の複合体結晶化を示し、そして図39(b)は最もよく最適化された結晶を示す。 20

【図40】図40は、Fab A44/PAI-1複合体の棒状単結晶を示す。

【図41】図41は、Fab A44認識ヒトPAI-1の活性形態及びcyno PAI-1の潜在形態を示す。

【図42】図42は、(A)活性ヒトPAI-1、及び(B)潜在cyno PAI-1でのFab A44により認識されたPAI-1エピトープを示す。

【図43】図43は、Fab A44/PAI-1複合体の重鎖パラトープを示す。

【図44】図44は、Fab A44/PAI-1複合体の軽鎖パラトープを示す。

【図45】図45は、カニクイザル、ヒト、ラット、及びマウスPAI-1の推定A44結合エピトープの配列整列を示す。配列は、配列番号1(PAI-1ヒト)、配列番号162(PAI-1カニクイザル)、配列番号163(PAI-1マウス)、及び配列番号164(PAI-1ラット)から抜粋される。 30

【図46】図46は、マウスPAI-1構造のヒトPAI-1/A44V11複合体との比較を示す。

【図47】図47は、ヒトPAI-1/A44V11複合体の構造及びPAI-1へのビトロネクチン結合のモデルを示す。

【図48】図48は、cyno-PAI-1の消化性ペプチド包括度(coverage)(配列番号162)を示す; 95.3%配列範囲が150個の重複する消化性ペプチドから得られる。

【図49】図49は、未結合(円線)、APGv2-結合(x-線)及びA44v11-結合(ひし形線)の状態のカニクイザル(cyno)-PAI-1ペプチドについての代表的な重水素取り込みプロットを示す。残基の範囲/位置は配列番号162からのものである。(A)大部分の消化性ペプチドは、cyno-PAI-1単独といずれかのmAbと結合したcyno-PAI-1との間で差異を示さなかった。(B)、残基44~64に及ぶペプチドは、両方のmAb-結合状態において交換からの同様の保護を示した。(C)、295~322を組み込んだペプチドは、両方のmAb-結合状態においてより少ない重水を取り込むが保護の大きさはA44v11についてより高い。 40

【図50】図50は、cyno-PAI-1単独及びA44v11に結合したcyno-PAI-1の水素/重水素交換(HDX)比較を示す。(A)、上の未結合状態及び下の結合状態を含む平均相対的部分交換のバタフライプロット(butterfly plot)。線は10秒、1分、5分、及び240分の時点に取得されたデータに対応する。(B)において、cyno-PAI-1単独又はA44v11に結合したcyno-PAI-1についての上記の(A)におけるプロットからの差異データ(ダルトン)のプロット。

【図51】図51は、cyno-PAI-1単独及びAPGv2に結合したcyno-PAI-1のHDX比較を示す。(A)において、上の未結合状態及び下の結合状態を含む平均相対的部分交換のバタフライプロット。線は10秒、1分、5分、及び240分の時点に取得されたデータに対応する。(B)に 50

おいて、cyno-PAI-1単独又はAPGv2に結合したcyno-PAI-1についての上記のパネル(A)からの差異データ(ダルトン)のプロット。

【図52】図52は、A44v11に結合したcyno-PAI-1及びAPGv2に結合したcyno-PAI-1のHDX比較を示す。(A)において、上のAPGv2結合状態及び下のA44v11結合状態を含む平均相対的部分交換のバタフライプロット。線は10秒、1分、5分、及び240分の時点に取得されたデータに対応する。(B)において、APGv2又はA44v11に結合したcyno-PAI-1についての上記パネル(A)からの差異データ(ダルトン)のプロット。

【図53】図53は、HDX MSにより決定されたcyno-PAI-1:A44v11エピトープを示す。A44v11抗体結合状態で交換からの保護を示すcynoPAI-1(配列番号162)の残基は太字で示される。結晶化研究から決定されたcyno-PAI-1:A44v11エピトープの残基を枠に示す。 10

【発明を実施するための形態】

【0073】

詳細な説明

本発明は、ヒトPAI-1に特異的に結合してPAI-1の生物学的機能を調節する抗体及びそのフラグメントを提供する。このような抗体は、PAI-1関連疾患又は障害(例えば、線維症)を処置するために特に有用である。本発明はまた、医薬組成物、さらにはPAI-1抗体をコードする核酸、組み換え発現ベクター及びこのような抗体、又はそのフラグメントを製造するための宿主細胞を提供する。インピトロ又はインピボのいずれかで、PAI-1を検出するため、又はPAI-1活性を調節するために本明細書に開示される抗体を使用する方法もまた本発明に包含される。 20

【0074】

1. 定義

本発明がより容易に理解され得るために、特定の用語が最初に定義される。

【0075】

本明細書で使用される用語「ヒトPAI-1」は、以下に記載されるアミノ酸配列を含むか又はそれからなるペプチドを指す：

VHHPPSYVAHLASDFGVVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTGGETQQQIQAAMGFKIDDKGMAPALRHLYK
ELMGPWNKDEI STTDAI FVQRDLKLVQGFMPHFFRLFRSTVKQVDFSEVERARFI INDWVKTHTKGMISNLLGKGAVDQL
TRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAAP
YEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGNMTRLPRLVLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPLHVAQA
LQKVKIEVNESGTVAASSSTAVIVSARMAPEEIMDRPFLFVVRHNPTGTVLFMGQVMEP (配列番号1)、又はそのフラグメント。 30

【0076】

本明細書で使用される用語「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む免疫グロブリン分子、さらにはその多量体(例えば、IgM)を指す。各重鎖は、重鎖可変領域(V_H又はVHと省略される)及び重鎖定常領域(C_H又はCH)を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C_H1、C_H2及びC_H3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(V_L又はVLと省略される)及び軽鎖定常領域(C_L又はCL)と省略される。軽鎖定常領域は1つのドメイン(C_L1)を含む。V_H及びV_L領域は、より保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域が組み入れられた、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域へとさらに細分され得る。各V_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置された3つのCDR及び4つのFRから構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。 40

【0077】

本明細書で使用される用語抗体の「抗原結合フラグメント」は、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、いずれかの天然に存在する、酵素により得られる合成又は遺伝子操作されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合フラグメントは、例えば、完全抗体分子から、いずれかの適切な標準的技術、例えばタンパク質分解消化、又は抗体可変ドメイン及び場合により定常ドメインをコードするDNAの操作及び発現を含む組み換え遺伝子操作技術を使用して誘導され得る。抗原結合部分の非限定的な例としては:(i) 50

Fabフラグメント;(ii)F(ab')₂フラグメント;(iii)Fdフラグメント;(iv)Fvフラグメント;(v)単鎖Fv(scFv)分子;(vi)dAbフラグメント;及び(vii)抗体の超可変性領域(例えば、単離された相補性決定領域(CDR))を模倣したアミノ酸残基からなる最小認識単位が挙げられる。他の操作された分子、例えば二特異性抗体(diabodies)、三特異性抗体(triabodies)、四特異性抗体(tetrabodies)及びミニボディ(minibodies)もまた表現「抗原結合フラグメント」内に包含される。

【0078】

本明細書で使用される用語「CDR」又「相補性決定領域」は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる不連続な抗原結合部位を意味する。これらの特定の領域は、Kabat et al.、J. Biol. Chem. 252、6609-6616 (1977) 及び Kabat et al.、Sequences of protein of immunological interest. (1991)、及び Chothia et al.、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 及び MacCallum et al.、J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) により記載されており、ここで定義は、互いに対しても比較した場合のアミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。Kabat定義は配列変動性に基づく。全ての種の全てのIG及びTR V領域についてのIMGT一意の番号付けは、可変領域の構造の高い保存に依存する(Lefranc, Mp et al.、Dev comp. Immunol. 27:55-77、2003)。5,000より多くの配列を整列した後に設定されるIMGT番号付けは、フレームワーク及びCDRの定義を考慮にいれ、かつ組み合わせる。Clothia定義は、構造的ループ領域の位置に基づく。接触定義(MacCallum et al.)は、複合体結晶構造及び抗体-抗原相互作用の分析に基づく。上記に引用された参考文献の各々により定義されるとおりにCDRを包含するアミノ酸残基は、比較のために示される。本明細書に開示される一実施態様において、用語「CDR」は、Kabat定義により定義されるCDRである。本明細書に開示される別の実施態様において、CDRはIMGTにより定義されるCDRである。

【0079】

本明細書において使用される用語「フレームワーク(FR)アミノ酸残基」は、Ig鎖のフレームワーク領域におけるアミノ酸を指す。本明細書において使用される用語「フレームワーク領域」又は「FR領域」は、可変領域の一部であるが、CDRの一部ではないアミノ酸残基を含む(例えば、CDRの接触定義を使用して)。従って、可変領域フレームワークは、約100~120アミノ酸長であるが、CDRの外側のアミノ酸しか含まない。

【0080】

本発明はまた、本明細書において開示される抗体のCDRアミノ酸配列における「保存的アミノ酸置換」、すなわち、抗原、すなわちPAI-1への抗体の結合を無効にしないアミノ酸改変を包含する。保存的置換は、その位置でのアミノ酸残基の極性又は電荷に対してほとんど影響がないか又は全く影響がないような、ネイティブでない残基でのネイティブアミノ酸残基の置換である。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基のいずれかの他の非極性残基での置き換えから生じる。さらに、ポリペプチド中のいずれかのネイティブ残基はまた、以前に「アラニンスキャニング変異誘発」(Cunningham et al.、Science 244:1081-85 (1989))について記載されたように、アラニンで置換され得る。保存的アミノ酸置換は、1つのクラスのアミノ酸の、同じクラスのアミノ酸による置換を含み、この場合、クラスは一般的な物理化学的アミノ酸側鎖特性、及び例えば標準的Dayhoff頻度交換マトリックス(frequency exchange matrix)又はBLOSUMマトリックスにより決定される、天然に見いだされる相同タンパク質中の高い置換頻度により定義される。アミノ酸側鎖の6つの一般的なクラスが分類されており、これには以下が含まれる:クラスI(Cys);クラスII(Ser、Thr、Pro、Ala、Gly);クラスIII(Asn、Asp、Gln、Glu);クラスIV(His、Arg、Lys);クラスV(Ile、Leu、Val、Met);及びクラスVI(Phe、Tyr、Trp)。例えば、別のクラスIIIの残基、例えばAsn、Gln、又はGluの代わりにAspを用いることは、保存的置換である。従って、PAI-1抗体中の予測非必須アミノ酸残基は、同じクラスからの別のアミノ酸残基で置き換えられる。抗原結合を除去しないアミノ酸保存的置換を同定する方法は当該分野で周知である(例えば、Brummell et al.、Biochem. 32:1180、1993; Kobayashi et al.、Protein Eng. 12:879、1999; 及び Burks et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 50

10

20

30

40

50

412、1997を参照のこと)。保存的アミノ酸置換についての一般的な規則を以下の表1に示す。

【0081】

【表1】

表1:保存的アミノ酸置換

元の残基	典型的な置換	選択(Select)置換	
Ala	Val、Leu、Ile	Val	
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys	10
Asn	Gln、His、Lys、Arg	Gln	
Asp	Glu	Glu	
Cys	Ser	Ser	
Gln	Asn	Asn	
Glu	Asp	Asp	
Gly	Pro、Ala	Ala	
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg	
Ile	Leu、Val、Met、Ala、 Phe、ノルロイシン	Leu	20
Leu	ノルロイシン、Ile、 Val、Met、Ala、Phe	Ile	
Lys	Arg、Gln、Asn	Arg	
Met	Leu、Phe、Ile	Leu	
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、 Tyr	Leu	
Pro	Ala	Ala	30
Ser	Thr	Thr	
Thr	Ser	Ser	
Trp	Tyr、Phe	Tyr	
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe	
Val	Ile、Met、Leu、Phe、 Ala、ノルロイシン	Leu	

【0082】

保存的アミノ酸置換はまた、生体系における合成によるよりもむしろ化学的ペプチド合成により典型的に組み込まれる天然に存在しないアミノ酸残基も包含する。これらとしては、ペプチド模倣物、及びアミノ酸部分の他の逆又は反転した形態が挙げられる。

【0083】

アミノ酸配列に対する保存的改変(及びコードヌクレオチドに対する対応する改変)は、天然に存在するPAI-1抗体の特徴と類似した機能的及び化学的特徴を有するPAI-1抗体を生じると期待される。対照的に、PAI-1抗体の機能的又は化学的特徴における実質的な改変は、(a)例えば、シート若しくはらせんコンホメーションのような、置換の領域における分子骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の体積を維持することに対するそれらの効果が有意に異なる置換を選択することにより達成され得る。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づくグループにわけられ得る:

1)疎水性:ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

- 2) 中性親水性:Cys、Ser、Thr;
- 3) 酸性:Asp、Glu;
- 4) 塩基性:Asn、Gln、His、Lys、Arg;
- 5) 鎮配向に影響を及ぼす残基:Gly、Pro; 及び
- 6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。

【0084】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラスのメンバーの交換を含み得る。このように置換された残基は、非ヒトPAI-1抗体と相同なヒトPAI-1抗体の領域中に、又はその分子の相同でない領域中に導入され得る。

【0085】

特定の局面において、重鎖又は軽鎖可変領域は、本明細書に開示される可変領域配列のいずれかと99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、又は90%同一であり得る。

【0086】

本明細書で使用される用語「に特異的に結合する」は、 $1 \times 10^{-6} M$ 、 $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-10} M$ 、 $1 \times 10^{-11} M$ 、 $1 \times 10^{-12} M$ 又はそれ以下より低いKdで抗原に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの能力を指す。この用語はまた、非特異的抗原についてのその親和性よりも少なくとも2倍高い親和性で抗原に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの能力を包含し指す。

【0087】

本開示はまた、競合結合を決定するための当該分野で公知のいずれかの方法、例えば本明細書に記載されるイムノアッセイにより決定して、本明細書に開示されるエピトープへの抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。特定の実施態様において、この抗体は、エピトープへの結合を、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、又は少なくとも50%競合的に阻害する。

【0088】

本明細書で使用される用語「抗原」は、抗体又はその抗原結合フラグメントにより認識される結合部位又はエピトープを指す。

【0089】

本明細書で使用される用語「ベクター」は、連結されている別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を指すことを意図される。ベクターの一種は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが結合され得る環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはウイルスゲノムに結合され得る。特定のベクターは、それらが導入されている宿主細胞において自己複製することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、そしてそれにより宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を方向づけることができる。このようなベクターは、本明細書で「組み換え発現ベクター」(又は単純に、「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。用語「プラスミド」及び「ベクター」は、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、発現ベクターのこのような他の形態、例えばウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ隨伴ウイルス)を含むことを意図され、これらは等価な機能を果たす。

【0090】

多数の発現ベクター系が、本発明の目的のために使用され得る。例えば、1つのクラスのベクターは、牛パピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス(RSV、MMTV又はMOMLV)又はSV40ウイルスのような動物ウイルス由来であるDNAエレメントを利用する。その他は、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロニック系の仕様を含む。さらに、それらの染色体にDNAを

10

20

30

40

50

組み込まれた細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ又はそれ以上のマーカーを導入することにより選択され得る。マーカーは、栄養要求性宿主へ原栄養性、殺生物剤抵抗性(例えば、抗生物質)又は銅のような重金属に対する抵抗性を提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、発現させようとするDNA配列に直接連結されても、同時形質転換により同じ細胞中に導入されてもいずれでもよい。さらなるエレメントもまた、mRNAの最適な合成のために必要とされ得る。これらのエレメントとしては、シグナル配列、スプライスシグナル、さらには転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが挙げられ得る。特定の実施態様において、クローンされた可変領域遺伝子は、上で考覈されたように合成の、重鎖及び軽鎖定常領域遺伝子(例えばヒト)と一緒に発現ベクター中に挿入される。

10

【0091】

より一般的に、抗体又はそのフラグメントをコードするベクター又はDNA配列が製造されると、発現ベクターは適切な宿主細胞中に導入され得る。すなわち、宿主細胞が形質転換され得る。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当業者に周知の様々な技術により達成され得る。これらとしては、限定されないが、トランスフェクション(電気泳動及びエレクトロポレーションを含む)、原形質融合、リン酸カルシウム沈降、細胞融合、エンベロープ(enveloped)DNAを用いた細胞融合、マイクロインジェクション、及びインタクトなウイルスでの感染が挙げられる。Ridgway、A. A. G. 「Mammalian Expression Vectors」 Chapter 24.2、pp. 470-472 Vectors、Rodriguez and Denhardt、Eds. (Butterworths、Boston、Mass. 1988)を参照のこと。本明細書に開示される実施態様は、エレクトロポレーションによる宿主へのプラスミド導入である。形質転換された細胞を、軽鎖及び重鎖を產生するために適した条件下で増殖させ、そして重鎖又は軽鎖タンパク質合成についてアッセイする。例となるアッセイ技術としては、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、又は蛍光活性化セルソーター分析(FACS)、免疫組織化学などが挙げられる。

20

【0092】

本明細書で使用される用語「形質転換」は、遺伝子型を変化させ、そして結果的にレシピエント細胞における変化を生じる、レシピエント宿主細胞へのDNAの導入のことを参考するために広い意味で使用されるものとする。

30

【0093】

「宿主細胞」は、組み換えDNA技術を使用して構築され、そして少なくとも1つの非相同遺伝子をコードするベクターを用いて形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からのポリペプチドの単離のための方法の記載において、用語「細胞」及び「細胞培養物」は、そうではないと明確に特定されていなければ、抗体の供給源を示すために交換可能に使用される。換言すると、「細胞」からのポリペプチドの回収は、沈降した全細胞から、又は培地及び懸濁した細胞の両方を含有する細胞培養物からのいずれかを意味し得る。

【0094】

当然のことながら、この用語は、特定の対象の細胞だけでなく、このような細胞の子孫も指すと意図される。特定の改変が突然変異又は環境の影響に起因して後続の世代において発生し得るので、このような子孫は、実際には、親細胞と同一でないかもしれないが、本明細書において使用される用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

40

【0095】

本明細書で使用される用語「処置する」、「処置すること」、及び「処置」は、本明細書において記載される治療的又は予防的な手段を指す。「処置」方法は、疾患若しくは障害の1つ若しくはそれ以上の症状、若しくは疾患若しくは障害の再発を予防、治癒、遅延、重症度を低減、もしくは寛解するため、又はこのような処置が存在しない場合に期待される生存を超える被験体の生存を延長させるために、被験体、例えばPAI-1関連疾患若しくは障害(例えば、線維性疾患)を有するか又はこのような疾患若しくは障害にかかりやすい被験体に、本明細書に開示される抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを使用する。

50

【0096】

本明細書で使用される用語「PAI-1関連疾患又は障害」は、PAI-1の変更されたレベル又は活性が見られる、疾患状態に関連する症状を伴うか又は伴わない疾患状態を含む。例となるPAI-1関連疾患又は状態としては様々な種類の線維症が挙げられる。

【0097】

本明細書で使用される用語「有効量」は、被験体に投与された場合に、本明細書に記載されるようなPAI-1関連疾患又は障害の処置、予後又は診断を達成するために十分である、PAI-1に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの量を指す。治療有効量は、処置される被験体及び疾患状態、被験体の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与方法などに依存して変化し、これらは当業者により容易に決定され得る。投与のための投薬量は、本明細書において開示される抗体又はその抗原結合フラグメント例えば、約1ng～約10,000mg、約1μg～約5,000mg、約1mg～約1,000mg、約10mg～約100mgの範囲に及び得る。投薬計画は、最適な治療応答を生じるように調整され得る。有効量はまた、抗体又はその抗原結合フラグメントのいずれかの毒性又は有害な効果（すなわち、副作用）が最少にされるか有益な効果がそれを上回る量である。10

【0098】

本明細書で使用される用語「被験体」又は「哺乳動物」は、いずれかのヒト又は非ヒト動物を含む。

【0099】

本明細書で使用される用語「エピトープ」は、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原が1つより多いエピトープを有していてもよい。従って、異なる抗体は、抗原の異なる領域に結合し得、そして異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、構造的（conformational）又は線状のいずれでもよい。構造的エピトープは、線状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸により生じる。線状エピトープは、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基により生じるものである。20

【0100】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される、単数形「a」、「an」、及び「the」は、そうではないと明確に指示されていなければ、複数の言及を含むということをここで指摘する。30

【0101】

II. 抗PAI-1抗体

一局面において、本発明は、ヒトPAI-1に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。本明細書に開示される例となるVH、VL及びCDRアミノ酸配列及び又クレオチド配列は表2に示される。表2に示されるCDR領域はIMGTにより定義される。

【0102】

【表2】

表2:例となる抗PAI-1抗体又はそのフラグメントのVH、VL及びCDRアミノ酸配列

抗体	配列	配列番号
mA105 VH	QVQLQQSGAELMKGPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWKQRPGLGLEWIG EILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAFMQLSSLTSEDSAVYYCAR GGLYYDLDYWGQGTILTVDSSAKTTPP	2
mA105 VL	DVVTQTPPLTSVTIGQPASICKSSQSLLSDGKTYLNWLLQRPQGPSP QRLLSILVSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKLRSRVEADLGVYYCWQDRH FPRTEGGTKEIKRAD	3
mA39 VH	QVQLQQSGAELMKGPGASVKISCKATGTYFNIYWIQWVKQRPGLGLEWIG EILPGSNTNYNEKFKDKAFTADSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARL GIGLRGALDYWGQGTTSVTVSSAKTTPP	4
mA39 VL	DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWSYHQKQGKSPQLLVY NAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNKSLQPEDFGTFYCQHRYGSPWTF GGGTKEIKRAD	5
mA44 VH	EMQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSMTNGYWNWIRKFPGNKLEYMG YITYSGSTYYNPNSLKGRISETRNTSKNQYYLQLSSVTTEDTATYYCARW HYGSPYYFDYWGQGTTLTVDSSAKTTPP	6
mA44 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWLQKPGKSPKTLIY RANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYSLSITSSLEYEDMGIYYCLQYDEFPPTF GGGTKEIKRAD	7
mA71 VH	QVQLQQSGAELMKGPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQRPGLDWIG EILPGSGNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTVYMQLSSLTSEDSAVYYCAR GGLYYNLDWGQGTTLTVDSSAKTTPP	8
mA71 VL	DVVTQTPPLTSVTIGQPASICKSSQSLLSDGKTYLYWLLQRPQGPSP KRLLYLVSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYYCWQDTH FPRTEGGTKEIKRAD	9
mA75 VH	QGQLQQSGAELMKGPGASVKISCKASGFTFSTYWIWIKQRPGLGLEWIA EILPGSGLTNYNEIFRGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR GGLYYAMDYWGQGTTSVTVSSAKTTP	80
mA75 VL	DVVTQTPPLTSVTIGQPASICKSSQSLLSEKGKTYLNWLFQRPQGPSPK RLIYLVCKLDCGVPDFRTGSGSGTDFTLKISRVEGEDLGVYYCWQGSHF PQTFGGTKEIKRAD	81
mA109 VH	EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPQGLEWIG AIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDTTYNQKFDKAKLAVASASTAYMEV SSLTNEDSAVYYCTRGLRRWGAMDYWGQGTTSVTVSSAKTTPP	10

【0103】

【表3】

mB109 VL	DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSI PCKASQDVSSAVAWYQQKLGQSPKLLIY SASFRTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTF GGGTNLEIKRAD	11
mB28 VH	QVQLQQSGAELMKGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQRPGGLEWIGK ILPGSGGANYNEKFKGKATVTADTSSNTVYMQQLSSLTSEDASAVYYCARL STGTRGAFDYWGQGTTLTVSSAKTTPP	12
mB28 VL	DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVSYLAWYQQKQGKSPQLLVY NAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLQPEDFGSYYCQHHYGTPTF GGGTKEIKRAD	13
mC45 VH	QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPGQGLEWIG VIHPGSGVTINYNEKFKGKAILTADKSSSTAYMQQLSSLTSDDSAVYFCAR DYYGSSHGLMDYWGQGTSVTVSS	14
mC45 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIY RANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYDMGIYYCLQYDEFPRTF GGGTKLEIK	15
mE16 VH	EVKLVESGGLVKPGGSLKLSCAAAGFTFSNYGMSWVRQTPEKGLGWVA SLRTGGNTYYSDSVKGRFTISRDNDRNILYLMQSSLTSEDATAVYYCARG LRHWGYFDVWGAGTTVTVSS	16
mE16 VL	DIVMTQSHKFMSTSVDGRVNITCKASQDVSTAVGWYQQEPGQSPKLLIY SASNRRHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPWTF GGGTKLEIK	17
mE21 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIG WIDPENGDTYEYDPKQAKATMTADTSSNTAYLQQLSSLTSEDATAVYYCMY GNYPYYFDYWGQGTTLTVSS	18
mE21 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITSCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTF GGGTKLEIK	19
mA105 HCDR3	ARGGLYYDLDY	20
mA105 HCDR2	ILPGSGST	21
mA105 HCDR1	GFTFSIYW	22
mA105 LCD3	WQDRHFPRT	23
mA105 mA71 LCDR2	LVS	24
mA105 mA71 LCDR1	QSLLSDGKTY	25

【0104】

【表4】

mA39 HCDR3	ARLGIGLRGALDY	26
mA39 HCDR2	ILPGSNT	27
mA39 HCDR1	GYTFNIYW	28
mA39 LCDR3	QHRYGSPWT	29
mA39 LCDR2	NAK	30
mA39 LCDR1	ENIYSY	31
mA44 HCDR3	ARWHYGSPYYFDY	32
mA44 HCDR2	ITYSGST	33
mA44 HCDR1	GDSMTNGY	34
mA44 LCDR3	LQYDEFPPPT	35
mA44 LCDR2	RAN	36
mA44 LCDR1	QDINSY	37
mA71 HCDR3	ARGGLYYNLDs	38
mA71 HCDR2	ILPGSGNT	39
mA71 HCDR1	GFTFSTYW	40
mA71 LCDR3	WQDTHFPRT	41
mA71 LCDR2	LVS	42
mA71 LCDR1	QSLLSDGKTY	43

【表5】

mA75 HCDR3	ARGGLYYAMDY	44
mA75 HCDR2	ILPGSGLT	45
mA75 HCDR1	GFTFSTYW	46
mA75 LCDR3	WQGSHFPQT	47
mA75 LCDR2	LVC	48
mA75 LCDR1	QSLLDSEGKTY	49
mB109 HCDR3	TRGLRRWGAMDY	50
mB109 HCDR2	ILPGSGLT	51
mB109 HCDR1	GFTFSTYW	52
mB109 LCDR3	QQHYSSPYT	53
mB109 LCDR2	SAS	54
mB109 LCDR1	QDVSSA	55
mB28 HCDR3	ARLSTGTRGAFDY	56
mB28 HCDR2	ILPGSGGA	57
mB28 HCDR1	GYTFSISW	58
mB28 LCDR3	QHHYGTTPPT	59
mB28 LCDR2	NAK	60
mB28 LCDR1	ENVYSY	61
mC45 HCDR3	ARDYYGSSHGLMDY	62
mC45 HCDR2	IHPGSGVT	63
mC45 HCDR1	GYAFTNYL	64
mC45 LCDR3	LQYDEFPRT	65
mC45 LCDR2	RAN	66
mC45 LCDR1	QDINSY	67
mE16 HCDR3	ARGLRHGYFDV	68
mE16 HCDR2	LRTGGNT	69

【表6】

mE16 HCDR1	GFTFSNYG	70
mE16 LCDR3	QQHYSSPWT	71
mE16 LCDR2	SAS	72
mE16 LCDR1	QDISNY	73
mE21 HCDR3	MYGNYPYYFDY	74
mE21 HCDR2	IDPENGDT	75
mE21 HCDR1	GFNIKDY	76
mE21 LCDR3	QQGNTLPWT	77
mE21 LCDR2	YTS	78
mE21 LCDR1	QDISNY	79
m=マウス; VH=可変重鎖; VL=可変軽鎖;		

【0107】

別の実施態様において、本発明は、同じエピトープに結合するか又は配列番号6及び7にそれぞれ示されるVH及びVL領域アミノ酸配列を含む抗体又はその抗原結合フラグメントを競合的に阻害する抗PAI-1抗体を提供する。このような抗体は、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)ベースの競合アッセイを含む通常の競合結合アッセイを使用して同定され得る。

【0108】

III. 改変された抗PAI-1抗体

特定の実施態様において、本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、1つ又はそれ以上の改変を含み得る。本明細書に開示される抗PAI-1抗体の改変された形態は、当該分野で公知のいずれかの技術を使用して製造され得る。

【0109】

i) 免疫原性の減少

特定の実施態様において、本明細書に開示される抗PAI-1抗体、又はその抗原結合フラグメントは、当該分野で認識された技術を使用して免疫原性を減少させるために改変される。例えば、抗体又はそのフラグメントは、キメラ化(chimerized)、ヒト化(humanized)、又は脱免疫化(deimmunized)され得る。

【0110】

一実施態様において、本明細書に開示される抗体、又はその抗原結合フラグメントはキメラであってもよい。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種由来である抗体、例えばマウスモノクローナル抗体由来の可変領域及びヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。キメラ抗体又はそのフラグメントを製造する方法は当該分野で公知である

10

20

30

40

50

。例えば、Morrison、*Science* 229:1202、1985; Oi et al.、*BioTechniques* 4:214、1986; Gillies et al.、*J. Immunol. Methods* 125:191、1989; 米国特許第5,807,715号; 同第4,816,567号; 及び同第4,816,397号(これらはそれらの全体として参照により本明細書に加入される)を参照のこと。「キメラ抗体」の製造のために開発された技術(Morrison et al.、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851、1984; Neuberger et al.、*Nature* 312:604、1984; Takeda et al.、*Nature* 314:452、1985)は、上記分子の合成に使用され得る。例えば、マウス抗PAI-1抗体分子の結合特異性をコードする遺伝子配列は、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の配列と一緒に融合され得る。本明細書で使用されるキメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種由来である分子、例えばマウスモノクローナル抗体由来の可変領域及びヒト免疫グロブリン定常領域を有するもの、例えばヒト化抗体である。

10

【0111】

別の実施態様において、本明細書に開示される抗体、又はその抗原結合フラグメントはヒト化されている。ヒト化抗体は、非ヒト抗体由来の1つ又はそれ以上の相補性決定領域(CDR)及びヒト抗体分子由来のフレームワーク領域を含む結合特異性を有する。しばしば、ヒトフレームワーク領域におけるフレームワーク残基は、抗原結合を変更するか又は改善するために、CDRドナー抗体からの対応する残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当該分野で周知の方法により、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDR及びフレームワーク残基の相互作用のモデリング並びに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較により同定される。例えば、Queen et al.、U.S. Patent No. 5,585,089; Riechmann et al.、*Nature* 332:323、1988(これらはそれら全体として参照に本明細書に加入される)を参照のこと。抗体は、例えば、CDR-グラフティング(EP 239,400; 国際公開第WO 91/09967号; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号; 及び同第5,585,089号)、ベニアリング(veneering)又はリサーフェイシング(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan、*Molecular Immunology* 28:489、1991; Studnicka et al.、*Protein Engineering* 7:805、1994; Roguska. et al.、*PNAS* 91:969、1994)、並びに鎖シャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)を含む当該分野で公知の様々な技術を使用してヒト化することができる。

20

【0112】

特定の実施態様において、免疫認識の間又は免疫認識時の抗体の分子可動性の影響に基づくヒト化方法が使用される(国際公開第WO2009/032661号(その全体として参照により本明細書に加入される)を参照のこと)。タンパク質可動性は、タンパク質分子の分子運動に関連する。タンパク質可動性は、タンパク質全体、タンパク質の一部、又は単一のアミノ酸の、互いに有意に異なるコンホメーションの集団に適合する能力である。タンパク質可動性についての情報は、タンパク質X線結晶学実験(例えば、Kundu et al.、*Biophys. J.* 83:723、2002を参照のこと)、核磁気共鳴実験(例えば、Freedberg et al.、*J. Am. Chem. Soc.* 120:7916、1998を参照のこと)を行うことにより、又は分子力学(MD)シミュレーションを実行することにより得ることができる。タンパク質のMDシミュレーションはコンピュータで行われ、そして原子の互いとの物理的相互作用を計算することにより、一定期間にわたる全てのタンパク質原子の動きを決定することが可能になる。MDシミュレーションの出力は、シミュレーションの期間にわたる調べられたタンパク質の軌跡である。軌跡は、タンパク質コンホメーションの集合であり、スナップショットとも呼ばれ、これはシミュレーションの期間にわたって周期的に、例えば1ピコ秒(p s)ごとにサンプリングされる。スナップショットの集合を分析することにより、タンパク質アミノ酸残基の可動性を定量することができる。従って、可動性残基は、その中にその残基が存在するポリペプチドの状況で異なるコンホメーションの集合に適合するものである。MD法は当該分野で公知であり、例えばBrooks et al.「*Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics*」(Wiley、New York、1988)を参照のこと。Amber(Case et al. *J. Comp. Chem.* 26:1668、2005; Brooks et al. *J. Comp. Chem.* 4:187、1983; 及びMacKerell et al.(1998)「*The Encyclopedia of Computational Chemistry*」vol. 1:271-177、Schleyer et al.、eds. Chichester: John Wiley & Sonsを参照のこと)又はI

30

40

50

mpact(Rizzo et al. J. Am. Chem. Soc.; 122:12898、2000を参照のこと)のようないくつかのソフトウェアは、MDシミュレーションを可能にする。

【0113】

大部分のタンパク質複合体は、比較的大きな平らな埋まっている表面を共有し、そして結合パートナーの可動性は、それらの柔軟性の原因を提供し、それらが互いにコンホーメーション的に適合することを可能にするということが示された(Sundberg and Mariuzza, Structure 8, R137-R142, 2000)。このようにして、「誘導された適合(induced fit)」の例は、タンパク質-タンパク質相互作用において主要な役割を果たすことが示された。さらに、徐々に増加する一連のデータがあり、タンパク質が実際は多様な形状、サイズ及び組成のリガンドに結合するということ(Protein Science 11:184-187, 2002)、並びにコンホーメーション多様性が異なるパートナーを認識する能力の必死な構成要素であると思われるということを示した(James et al., Science 299:1362, 2003)。可動性残基は、タンパク質-タンパク質パートナーの結合に関与する(Grunberg et al., Structure 14, 683, 2006)。

【0114】

可動性残基は、メモリーB細胞により認識されて免疫原性応答を誘発する可能性のある相互作用領域の集合を生じる様々なコンホーメーションに適合し得る。従って、抗体は、改変された抗体により示されるコンホーメーションの集合及び認識領域の集合がヒト抗体により適合されるものと可能な限り似るように、フレームワークからの多数の残基を改変することによりヒト化され得る。これは、限られた数の残基を:(1)親mAbの相同性モデルを構築し、MDシミュレーションを実行すること;(2)可動性残基を分析すること、及び非ヒト抗体分子の最も可動性の残基の同定、さらには異質性又は分解反応のもとである可能性のある残基又はモチーフを同定すること;(3)親抗体と最も類似した認識領域の集合を示すヒト抗体を同定すること;(4)変異しようとする可動性残基、異質性及び分解の基でありかつ変異もされる可能性のある残基又はモチーフを決定すること;並びに(5)既知のT細胞又はB細胞エピトープの存在をチェックすることにより改変することにより達成され得る。可動性残基は、本明細書において教示されるように暗溶媒モデルを使用してMD計算を使用して見出され得、これはシミュレーションの期間にわたる水溶媒のタンパク質原子との相互作用を説明する。

【0115】

一連の可動性残基が可変軽鎖及び重鎖内で同定されると、目的の抗体とよく類似した一連のヒト重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークが同定される。これは、抗体ヒト生殖系列配列のデータベースに対して一連の可動性残基に関して、例えば、BLAST検索を使用して行われ得る。また、親mAbの動力学を生殖系列標準構造のライブラリの動力学と比較することによっても行われ得る。CDR残基及び隣接する残基は、抗原についての高親和性が保存されることを確実にするために検索から排除される。次いで可動性残基は置き換えられる。

【0116】

いくつかのヒト残基が類似した相同性を示す場合、選択はヒト化抗体の溶液挙動に影響を及ぼす可能性のある残基の性質によっても促進される。例えば、極性残基は、疎水性残基上の露出した可動性ループにしばしば存在する。不安定性及び異質性の発生源となる残基もまた、たとえそれらがCDRで見出されても、変異される。これは、スルホキシド形成が酸素ラジカルから生じるので露出したメチオニン、Asp-Proジペプチドの結合のような酸に不安定な結合のタンパク質分解切断(Drug Dev. Res. 61:137, 2004)、露出したアスパラギン残基とそれに続く小さいアミノ酸、例えばGly、Ser、Ala、His、Asn又はCysとともに見られる脱アミド部位(J. Chromatog. 837:35, 2006)及びN-グリコシル化部位、例えばAsn-X-Ser/Thr部位を含む。典型的には、露出したメチオニンはLeuで置換され、露出したアスパラギンはグルタミン若しくはアスパラギン酸で置き換えられ、又はそれに続く残基が変更される。グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)については、Asn又はSer/Thr残基が変更される。

10

20

30

40

50

【0117】

得られた複合抗体配列を、既知のB細胞又は線状T細胞エピトープの存在についてチェックする。例えば、公開で利用可能なImmune Epitope Data Base(IEDB)(PLOS Biol.(2005)3(3)e91)を用いて検索が行われる。既知のエピトープが複合配列内に見られる場合、別の組のヒト配列を、取り込んで置換する。従って、米国特許第5,639,641号のサーフェイシング法と異なり、B細胞媒介及びT細胞媒介の両方の免疫原性応答がこの方法により対処される。この方法はまた、CDRグラフティング(米国特許第5,530,101号)で観察されることがある活性喪失の問題を回避する。さらに、安定性及び溶解性の問題もまた、操作及び選択の過程で考慮され、低免疫原性、高抗原親和性及び改善された生物物理学的特性について最適化された抗体を生じる。

10

【0118】

いくつかの実施態様において、脱免疫(de-immunization)は、抗体、又はその抗原結合フラグメントの免疫原性を減少させるために使用され得る。本明細書で使用される用語「脱免疫」は、T細胞エピトープを改変するための抗体、又はその抗原結合フラグメントの変更を含む(例えば、国際公開第W09852976A1号、同第W00034317A2号)。例えば、出発抗体由来のVH及びVL配列が分析され得、そして相補性決定領域(CDR)及び配列内の他の鍵となる残基に関連してエピトープの位置を示すヒトT細胞エピトープ「マップ」が、各V領域から生成され得る。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープは、最終抗体の活性を変更する危険性の低い代替のアミノ酸置換を同定するために分析される。アミノ酸置換の組み合わせを含む様々な代替のVH及びVL配列が設計され、そしてこれらの配列は、本明細書に開示される診断方法及び処置方法における使用のために様々なPAI-1特異的抗体又はそのフラグメントにその後組み込まれ、次いで機能について試験される。典型的には、12と24との間の変異抗体が生成され、試験される。次いで、改変されたV領域及びヒトC領域を含む完全な重鎖及び軽鎖遺伝子が発現ベクター中にクローニングされ、そしてそれに続くプラスミドが完全抗体の产生のために細胞株に導入される。次いで抗体を、適切な生化学的アッセイ及び生物学的アッセイにおいて比較し、そして最適な改変体を同定する。

20

【0119】

ii) エフェクター機能及びFc改変

本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、1つ又はそれ以上のエフェクター機能を媒介する抗体定常領域(例えば、IgG定常領域、ヒトIgG定常領域、ヒトIgG1又はIgG4定常領域)を含み得る。例えば、抗体定常領域に対する補体のC1成分の結合が補体系を活性化し得る。補体の活性化は、オプソニン作用及び細胞病原体の溶解において重要である。補体の活性化はまた炎症応答を刺激し、そして自己免疫過敏性にも関与し得る。さらに、抗体は、抗体Fc領域上のFc受容体結合部位が細胞上のFc受容体(FcR)に結合して、Fc領域を介して様々な細胞上の受容体に結合する。IgG(ガンマ受容体)、IgE(イプシロン受容体)、IgA(アルファ受容体)及びIgM(ミュー受容体)を含む様々なクラスの抗体に特異的な多数のFc受容体がある。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、貪食及び抗体被覆粒子の分解、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解(抗体依存性細胞介在性細胞傷害、又はADCCと呼ばれる)、炎症性メディエータの放出、経胎盤伝達(placental transfer)及び免疫グロブリン産生の制御を含む多数の重要な多様な生物学的応答を誘発する。特定の実施態様において、本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントは、Fc-ガンマ受容体に結合する。代替の実施態様において、本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、1つ若しくはそれ以上のエフェクター機能(例えば、ADCC活性)を欠いているか又はFc受容体に結合することができない定常領域を含み得る。

30

【0120】

本明細書に開示される特定の実施態様は、1つ又はそれ以上の定常領域ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸が欠失されているか、そうでなければ、ほぼ同じ免疫原性の完全な未変更抗体と比較した場合に、減少若しくは増強されたエフェクター機能、非共有結合で二量体化する能力、身体中の特定の部位に(例えば、腫瘍の部位又は特定期間に)局在

40

50

化する増加した能力、減少した血漿半減期、又は増加した血清半減期のような望ましい生化学的特徴を生じるように変更された抗PAI-1抗体を含む。例えば、本明細書に記載される診断及び処置方法における使用のための、特定の抗体、又はそのフラグメントは、免疫グロブリン重鎖と類似するが、1つ又はそれ以上の重鎖ドメインの少なくとも一部を欠くポリペプチド鎖を含むドメイン欠失抗体である。例えば、特定の抗体において、改変された抗体の定常領域の1つのドメイン全体が欠失され、例えば、CH2ドメインの全て又は一部が欠失される。

【0121】

特定の他の実施態様において、抗PAI-1抗体は、異なる抗体アイソタイプ由来の定常領域(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4の2つ又はそれ以上由来の定常領域)を含む。他の実施態様において、抗PAI-1抗体は、キメラヒンジ(すなわち、異なる抗体アイソタイプのヒンジドメイン由来のヒンジ部分、例えば、IgG4分子由来の上部ヒンジドメイン及びIgG1中間ヒンジドメインを含むヒンジ)を含む。一実施態様において、抗PAI-1抗体は、ヒトIgG4分子由来のFc領域またはその部分及びその分子のコアヒンジ領域におけるSer228Pro変異(Kabat番号付け)を含む。

【0122】

特定の抗PAI-1抗体において、Fc部分は、当該分野で公知の技術を使用してエフェクター機能を増加するか又は減少させるように変異され得る。例えば、定常領域ドメインの欠失又は不活化(点変異又は他の手段による)は、循環する改変された抗体のFc受容体結合を減少させ得、それにより腫瘍局在化を増加させる。他の場合、本発明と一致する定常領域の改変は、補体結合を緩和し、従って結合した細胞毒の血清半減期及び非特異的結合を減少させるかもしれない。定常領域のさらに他の改変は、ジスルフィド結合又はオリゴ糖部分を改変するために使用され得、増加した抗原特異性又は可動性に起因して増強された局在化を可能にする。腫瘍局在化、体内分布及び血清半減期のような、改変の得られた生理学的プロフィール、バイオアベイラビリティ及び他の生化学的効果は、過度の実験なしに、周知の免疫学的技術を使用して容易に測定及び定量され得る。

【0123】

特定の実施態様において、本明細書において開示される抗体において使用されるFcドメインはFc変異体である。本明細書で使用される用語「Fc変異体」は、そのFcドメインが由来する野生型Fcドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有するFcドメインを指す。例えば、ここでFcドメインはヒトIgG1抗体由来であり、上記ヒトIgG1 FcドメインのFc変異体は、上記Fcドメインと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

【0124】

Fc変異体のアミノ酸置換は、Fcドメイン内のいずれかの位置(すなわち、いずれかのEU協定(EU convention)アミノ酸位置)に位置し得る。一実施態様において、Fc変異体は、ヒンジドメイン又はその部分に位置するアミノ酸位置に置換を含む。別の実施態様において、Fc変異体は、CH2ドメイン又はその部分に位置するアミノ酸位置に置換を含む。別の実施態様において、Fc変異体は、CH3ドメイン又はその一部に位置するアミノ酸位置に置換を含む。別の実施態様において、Fc変異体は、CH4ドメイン又はその部分に位置するアミノ酸位置に置換を含む。

【0125】

本明細書に開示される抗体は、エフェクター機能又はFcR結合における改善(例えば、減少又は増強)を付与することが公知であるいずれかの当該分野で認められたFc変異体を使用し得る。上記Fc変異体は、例えば、国際PCT公開W088/07089A1、W096/14339A1、W098/05787A1、W098/23289A1、W099/51642A1、W099/58572A1、W000/09560A2、W000/32767A1、W000/42072A2、W002/44215A2、W002/060919A2、W003/074569A2、W004/016750A2、W004/029207A2、W004/035752A2、W004/063351A2、W004/074455A2、W004/099249A2、W005/040217A2、W005/070963A1、W005/077981A2、W005/092925A2、W005/123780A2、W006/019447A1、W006/047350A2、及びW006/085967A2又は米国特許第5,648,260号；同第5,739,277号；同第5,834,250号；同第5,869,046号；同第6,096,871号；同第6,121,022号；同第6,194,551号；同第6,242

10

20

30

40

50

, 195号；同第6,277,375号；同第6,528,624号；同第6,538,124号；同第6,737,056号；同第6,821,505号；同第6,998,253号；及び同第7,083,784号、（これらは各々、参照により本明細書に加入される）に開示されるアミノ酸置換のいずれか1つを含み得る。1つの例となる実施態様において、本明細書に開示される抗体は、EU位置268にアミノ酸置換（例えば、H268D又はH268E）を含むFc変異体を含み得る。別の例となる実施態様において、本明細書に開示される抗体は、EU位置239におけるアミノ酸置換（例えば、S239D又はS239E）又はEU位置332におけるアミノ酸置換（例えば、I332D又はI332Q）を含み得る。

【0126】

特定の実施態様において、本明細書に開示される抗体は、抗体の抗原非依存性エフェクター機能、特に抗体の循環半減期を変更するアミノ酸置換を含むFc変異体を含み得る。このような抗体は、これらの置換を欠く抗体と比較した場合にFcRnへの増加した又は減少した結合を示し、従って、それぞれ血清中で増加した又は減少した半減期を有する。FcRnに対する改善された親和性を有するFc変異体は、より長い血清半減期を有すると予想され、そしてこのような分子は、投与された抗体の長い半減期が望ましい場合、例えば、慢性疾患又は障害を処置するために、哺乳動物を処置する方法において有用性を有する。対照的に、減少したFcRn結合親和性を有するFc変異体は、より短い半減期を有すると期待され、そしてこのような分子は、例えば、短縮された循環時間が有利であり得る場合、例えばインビボ診断画像化法のため、又は出発抗体が長期間循環中に存在する場合に毒性副作用を有する状況において、哺乳動物に投与するためにも有用である。減少したFcRn結合親和性を有するFc変異体はまた、胎盤を通過する可能性が低く、従って、妊婦における疾患又は障害の処置においても有用である。さらに、減少したFcRn結合親和性が望ましいかもしれない他の適用としては、脳、腎臓又は肝臓局在化が望ましい適用が挙げられる。一つの例となる実施態様において、本明細書に開示される変更された抗体は、脈管構造から腎糸球体の上皮を横切る減少した輸送を示す。別の実施態様において、本明細書に開示される変更された抗体は、血液脳関門(BBB)を横切って、脳から脈管性間隙中への減少された輸送を示す。一実施態様において、変更されたFcRn結合を有する抗体は、Fcドメインの「FcRn結合ループ」内に1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。FcRn結合ループは、アミノ酸残基280～299(Kabat番号付けに従う)から構成される。FcRn結合活性を変更した例となるアミノ酸置換は、国際PCT公開第W005/047327号（参照により本明細書に加入される）に開示される。特定の例となる実施態様において、本明細書に開示される抗体、又はそのフラグメントは、以下の置換の1つ又はそれ以上を有するFcドメインを含む：V284E、H285E、N286D、K290E及びS304D(Kabat番号付け)。

【0127】

他の実施態様において、本明細書に記載される診断及び処置方法における使用のための抗体は、グリコシル化を減少させるか除去するように変更された定常領域、例えばIgG1又はIgG4重鎖定常領域を有する。例えば、本明細書に開示される抗体はまた、抗体のグリコシル化を変更するアミノ酸置換を含むFc変異体を含み得る。例えば、このFc変異体は、減少したグリコシル化を有し得る（例えば、N-又はO-連結グリコシル化）。例となる実施態様において、Fc変異体は、通常はアミノ酸位置297(EU番号付け)に見いだされるN-連結グリカンの減少したグリコシル化を含む。別の実施態様において、抗体は、グリコシル化モチーフ、例えば、アミノ酸配列NXT又はNXSを含有するN-連結グリコシル化モチーフの近傍又はそのグリコシル化モチーフ内にアミノ酸置換を有する。特定の実施態様において、抗体は、アミノ酸位置228又は299(EU番号付け)にアミノ酸置換を含むFc変異体を含む。より特定の実施態様において、抗体は、S228P及びT299A変異(EU番号付け)を含むIgG1又はIgG4定常領域を含む。

【0128】

減少又は変更されたグリコシル化を付与する例となるアミノ酸置換は、国際PCT公開第W005/018572号（本明細書に参照により加入される）に開示される。特定の実施態様において、本明細書に開示される抗体、又はそのフラグメントは、グリコシル化を除去するように改変される。このような抗体又はそのフラグメントは、「アグリ(agly)」抗体、又は

10

20

30

40

50

そのフラグメント(例えば、「アグリ」抗体)と呼ばれ得る。理論には拘束されないが、「アグリ」抗体、又はそのフラグメントは、インビボで改善された安全性及び安定性プロフィールを有し得ると考えられている。例となるアグリ抗体、又はそのフラグメントは、IgG4抗体の脱グリコシル化(aglycosylated)Fc領域を含み、これはFc-エフェクター機能を欠いており、それによりPAI-1を発現する正常重要臓器に対するFc媒介毒性についての可能性を除去する。さらに他の実施態様において、本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントは、変更されたグリカンを含む。例えば、抗体は、Fc領域のAsn297におけるN-グリカン上のフコース残基の減少した数を有し得、すなわち、脱フコシル化(afucosylated)される。別の実施態様において、抗体は、Fc領域のAsn297におけるN-グリカン上に変更された数のシアル酸残基を有し得る。

10

【0129】

iii) 共有結合

本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、共有結合がその同族エピトープへの抗体の特異的結合を妨げないように、抗体への分子の共有結合により改変され得る。例えば、限定としてではなく、本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントは、グリコシル化、アセチル化、ペグ化(pegylation)、リン酸化、アミド化、保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などにより改変され得る。多数の化学修飾のいずれかが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化などを含むがこれらに限定されない公知の技術により行われ得る。さらに、誘導体は、1つ又はそれ以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。

20

【0130】

本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントはさらに、N末端若しくはC末端で異種ポリペプチドに組み換えにより融合されても、ポリペプチド若しくは他の組成物に化学的に結合されてもよい(共有結合及び非共有結合を含む)。例えば、抗PAI-1抗体は、検出アッセイにおける標識、及び異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、又は毒素のようなエフェクター分子として有用な分子に組み換えにより融合されても結合されてもよい。例えば、国際PCT公開第W092/08495号；同第WO 91/14438号；同第W089/12624号；米国特許第5,314,995号；及びEP396,387を参照のこと。

【0131】

抗PAI-1抗体は、インビボ半減期を増加させるため、又は当該分野で公知の方法を使用するイムノアッセイにおける使用のために異種ポリペプチドに融合され得る。例えば、一実施態様において、PEGは本明細書に開示される抗PAI-1抗体に結合されてそれらのインビボでの半減期を増加させることができる(Leong, S. R., et al., Cytokine 16:106, 2001; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531, 2002; 又はWeir et al., Biochem. Soc. Transaction 30 s 30:512, 2002)。

30

【0132】

さらに、本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、それらの精製又は検出を容易にするためのペプチドのようなマーカー配列に融合され得る。特定の実施態様において、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、例えば、とりわけpQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)で提供されるタグであり、これらの多くは市販されている。例えば、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の便利な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定されないが、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ(Wilson et al., Cell 37:767, 1984)、及び「フラッグ」タグが挙げられる。

40

【0133】

本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、非結合体化形態で使用され得、又は例えば、分子の治療特性を改善するため、標的検出を容易にするため、又は患者の画像化又は治療のために、様々分子のうちの少なくとも1つに結合されてもよい。本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、精製が行われる場合、精製の前又は後のいずれかに標識されても結合体化

50

されてもよい。特に、本明細書に開示される抗PAI-1抗体は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物応答調節剤、医薬品、又はPEGに結合され得る。

【0134】

本発明はさらに、診断剤又は治療剤に結合された抗PAI-1抗体を包含する。抗PAI-1抗体は、例えば、所定の処置又は予防レジメンの有効性を決定するために、臨床試験手順の一部として、例えば免疫細胞障害（例えば、CLL）の発生又は進行をモニタリングするために、診断上使用され得る。検出は、抗PAI-1抗体を検出可能な物質にカップリングすることにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、様々な陽電子放出断層撮影を使用する陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。例えば、本発明に従う診断法としての使用のための抗体に結合され得る金属イオンについては米国特許第4,741,900号を参考のこと。適切な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の非限定的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン フルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の非限定的な例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の非限定的な例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；そして適切な放射性物質の非限定的な例としては、125I、131I、111In又は99Tcが挙げられる。

【0135】

本明細書に開示される診断方法及び処置方法における使用のための抗PAI-1抗体は、細胞毒（例えば、放射性同位体、細胞傷害性薬物、又は毒素）治療剤、細胞分裂阻害剤、生物毒素、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的応答調節物質、医薬品、免疫学的活性リガンド（例えば、リンホカイン又は得られた分子が腫瘍細胞及びT細胞のようなエフェクター細胞の両方に結合する他の抗体）、又はPEGに結合され得る。

【0136】

別の実施態様において、本明細書に開示される診断及び処置方法における使用のための抗PAI-1抗体は、腫瘍細胞成長を減少させる分子に結合され得る。他の実施態様において、開示された組成物は、薬物又はプロドラッグにカップリングされた、抗体又はそのフラグメントを含み得る。本明細書に開示されるなお他の実施態様は、リシン、ゲロニン、緑膿菌外毒素（*Pseudomonas exotoxin*）又はジフテリア毒素のような特定の生体毒素又はそれらの細胞傷害性フラグメントに結合された抗体又はそのフラグメントの使用を含む。どの結合した抗体又は結合していない抗体を使用するかという選択は、癌の種類及び段階、補助処置の使用（例えば、化学療法又は外部放射）並びに患者の状態に依存する。当然のことながら、当業者は、本明細書中の教示を考慮してこのような選択を容易に行い得る。

【0137】

当然のことながら、以前の研究において、同位体で標識された抗腫瘍抗体が、動物モデルにおいて、そしていくつかの場合にはヒトにおいて、腫瘍細胞を破壊するために首尾よく使用された。例となる放射性同位体としては：90Y、125I、131I、123I、111In、105Rh、153Sm、67Cu、67Ga、166Ho、177Lu、186Re及び188Reが挙げられる。放射性核種は、核DNAにおいて多重鎖切断を引き起こす電離放射線を生じることによって作用し、細胞死を引き起こす。治療用結合体を製造するために使用される同位体は、典型的には短い経路を有する高エネルギーアルファ粒子又はベータ粒子を生じる。このような放射性核種は、それらが近接している細胞、例えば結合体が結合付着しているか又は進入している腫瘍細胞を死滅させる。これらは局在化していない細胞に対してほとんど影響を及ぼさないか又は全く影響を及ぼさない。放射性核種は本質的に非免疫原性である。

【0138】

10

20

30

40

50

IV. 抗PAI-1抗体、又はその抗原結合フラグメントの発現

上記のように単離した遺伝子材料を操作して本明細書に開示される抗PAI-1抗体を得た後、特許請求される抗体、又はそのフラグメントの望ましい量を製造するために使用され得る宿主細胞中への導入のための発現ベクターに典型的には遺伝子を挿入する。

【0139】

他の実施態様において、本明細書において開示される抗PAI-1抗体又はそのフラグメントは、ポリシストロニック構築物を使用して発現され得る。このような発現系において、抗体の重鎖及び軽鎖のような複数の目的の遺伝子産物が、単一のポリシストロニック構築物から產生され得る。これらの系は、内部リボソーム進入部位(IRES)を有利に使用して、真核生物宿主細胞において比較的高レベルの本明細書に開示されるポリペプチドを得る。適合IRES配列は、米国特許第6,193,980号(参照により本明細書に加入される)に開示される。当業者は、このような発現系が本出願において開示される全範囲のポリペプチドを効率的に產生するために使用され得るということを理解するだろう。

10

【0140】

一実施態様において、抗体発現のために使用される宿主細胞株は、哺乳動物起源のものであり;当業者は、そこで発現させようとする所望の遺伝子産物に最も適した特定の宿主細胞株を決定することができる。例となる宿主細胞株としては、限定されないが、DG44及びDUXB11(チャイニーズハムスター卵巣系統、DHFRマイナス)、HELA(ヒト子宮頸癌)、CVI(サル腎臓系統)、COS(SV40 T抗原を含むCVIの誘導体)、R1610(チャイニーズハムスター線維芽細胞)BALBC/3T3(マウス線維芽細胞)、HAK(ハムスター腎臓系統)、SP2/0(マウス骨髄腫)、BFA-1c1BPT(ウシ内皮細胞)、RAJI(ヒトリンパ球)、293(ヒト腎臓)が挙げられる。一実施態様において、細胞株は、それらから発現された抗体の変更されたグリコシル化、例えば脱フコシル化(afucosylation)を提供する(例えば、PER.C6.RTM.(Crucell)又はFUT8-ノックアウトCHO細胞株(Potelligent.RTM.細胞)(Biowa、Princeton、N.J.))。一実施態様において、NS0細胞が使用され得る。CHO細胞は、特定の具体的な実施態様において使用され得る。宿主細胞株は、典型的には商業サービス、American Tissue Culture Collection又は公開された文献から入手可能である。

20

【0141】

インピトロ製造は、大量の所望のポリペプチドを得るためのスケールアップを可能にする。組織培養条件下での哺乳動物細胞培養のための技術は当該分野で公知であり、そしてエアリフト反応器若しくは連続攪拌反応器中の均質な懸濁培養物、又は例えば中空纖維、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズ若しくはセラミックカートリッジ上の、固定された若しくは捕捉された細胞培養物を含む。必要又は望ましい場合、ポリペプチドの溶液を、通常のクロマトグラフィー方法、例えばゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロース上でのクロマトグラフィー又は(免疫-)親和性クロマトグラフィーにより精製することができる。

30

【0142】

本明細書に開示される抗PAI-1抗体、又はそのフラグメントをコードする遺伝子はまた、細菌又は酵母又は植物細胞のような、発現された非哺乳動物細胞であり得る。この関連で、当然のことながら、様々な細菌のような単細胞非哺乳動物微生物もまた形質転換され得る;すなわち、培養又は発酵において増殖することができるもの。形質転換の影響を受けやすい細菌としては、腸内細菌科(enterobacteriaceae)、例えば大腸菌(Escherichia coli)又はサルモネラ(Salmonella)の系統;バチルス科(Bacillaceae)、例えば枯草菌(Bacillus subtilis);肺炎球菌(Pneumococcus);連鎖球菌(Streptococcus)、及びインフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)のメンバーが挙げられる。さらに当然のことながら、細菌で発現された場合、ポリペプチドは封入体の一部になり得る。ポリペプチドは、単離され、精製され、次いで機能性分子へと組み立てられなければならない。

40

【0143】

原核生物に加えて、真核生物微生物もまた使用され得る。出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)、すなわち一般的なパン酵母は、多数の他の系統が一般に利用可能であるが真

50

核生物微生物の中で最も一般的に使用される。酵母類における発現のために、例えば、プラスミドYRp7(Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))が一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファンにおいて成長する能力を欠く酵母の変異株についての選択マークターを生じるTRP1遺伝子を既に含有している、例えばATCC番号44076又はPEP4-1(Jones, Genetics, 85:12 (1977))。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのtrp1障害(lesion)の存在は、トリプトファンの存在しない場合の成長により形質転換を検出するため有効な環境を提供する。

【0144】

V. 抗PAI-1抗体の医薬製剤及び投与方法

10

別の局面において、本発明は、抗PAI-1抗体、またはそのフラグメントを含む医薬組成物を提供する。

【0145】

本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントを製造し、そして被験体に投与する方法は、周知であるか、又は当業者により容易に決定される。本明細書に開示される抗体、又はそのフラグメントの投与経路は、経口的、非経口的、吸入により又は局所的であり得る。本明細書で使用される用語非経口的は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋内、皮下、直腸又は腔投与を含む。非経口投与の静脈内、動脈内、皮下及び筋内の形態は、特定の実施態様において使用され得る。全てのこれらの投与形態は、本明細書に開示される範囲内であると明確に考慮されるが、投与のための形態は、注射用液剤、特に静脈内又は動脈内注射又は点滴用のものだろう。通常は、注射用の適切な医薬組成物は、緩衝液(例えば、酢酸、リン酸又はクエン酸緩衝液)、界面活性剤(例えばポリソルベート)、場合により安定剤(例えばヒトアルブミン)などを含み得る。しかし、本明細書における教示と適合する他の方法において、ポリペプチドは、有害な細胞集団の部位に直接送達することができ、それにより患部組織の治療剤への曝露を増加させる。

20

【0146】

非経口投与のための製剤は、滅菌の水性又は非水性の液剤、懸濁剤、及び乳剤を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、及びオレイン酸エチルのような注射可能有機エステルである。水性担体としては、食塩水及び緩衝化媒体を含む、水、アルコール性/水性溶液、エマルション又は懸濁液が挙げられる。本発明において、薬学的に許容しうる担体としては、限定されないが、0.01~0.1M(例えば0.05M)リン酸緩衝液又は0.8%食塩水が挙げられる。他の一般的な非経口ビヒクルとしては、リン酸ナトリウム溶液、リゲルブドウ糖、ブドウ糖及び塩化ナトリウム、乳酸リングル、又は固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体及び栄養補給剤、電解質補給剤、例えば、リゲルブドウ糖に基づくものなどが挙げられる。例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなどの保存料及び他の添加剤も存在し得る。より詳細には、注射使用に適した医薬組成物としては、滅菌水性液剤(水溶性の場合)又は注射用液剤若しくは分散の即時製剤のための分散及び滅菌粉末が挙げられる。このような場合、組成物は無菌でなくてはならず、そして容易な注射可能性(syringability)が存在する程度まで流動性であるべきである。これは製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきであり、そして一実施態様において、細菌及び真菌のような微生物の夾雜作用に対して守られる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、及びそれらの適切な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散の場合には必要な粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の活動の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどにより達成され得る。特定の実施態様において、等張剤、例えば糖類、マンニトールのような多価アルコール、ソルビトール、又は塩化ナトリウムが組成物中に含まれる。注射可能組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウ

30

40

50

ム及びゼラチンを組成物中に含めることによって起こり得る。

【0147】

いずれの場合も、滅菌注射用液剤が、活性化合物(例えば、それ自体又は他の活性剤と組み合わせた抗体)を必要量で、必要に応じて、本明細書に列挙された成分のうちの1つ又は組み合わせとともに適切な溶媒中に組み込み、続いて滅菌ろ過することにより製造され得る。一般的に、分散は、基本的な分散媒体及び上に列挙したものからの必要な他成分を含有する滅菌ビヒクル中に、活性化合物を加えることにより製造される。滅菌注射用液剤の製造のための滅菌粉末の場合、製造方法は、真空乾燥及び凍結乾燥であり得、これにより、活性成分と、その前もって滅菌ろ過した溶液からのさらなる望ましい成分との粉末が得られる。注射用の製剤を処理し、アンプル、バッグ、瓶、シリンジ又はバイアルのような容器中に充填し、そして当該分野で公知の方法に従って無菌条件下で密封する。さらに、製剤は、同時係属の米国出願第09/259,337号及び米国出願第09/259,338号(これらはそれぞれ参照により本明細書に加入される)に記載されるようなキットの形態で包装され販売され得る。このような製造品は、一実施態様において、添付の組成物が自己免疫障害又は新生物障害に罹患しているか又はそれらの素因を有する被験体を処置するために有用であるということを示すラベル又は添付文書を有する。

【0148】

上記の状態の処置のための、本明細書に開示される安定化された抗体又はそのフラグメントの有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理状態、患者がヒト又は動物のどちらか、投与される他の薬物、及び処置が予防的か又は治療的かを含む多くの様々な要因によって変わる。通常は、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む非ヒト動物も処置され得る。処置投薬量は、安全性及び有効性を最適化するために当業者に公知の通常の方法を使用して用量設定され得る。

【0149】

本明細書に開示される抗体を用いた受動免疫については、投薬量は、宿主体重の例えば、約0.0001~100mg/kg、そしてより通常には0.01~5mg/kg(例えば、0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kgなど)の範囲に及び得る。例えば、投薬量は、1mg/体重kg又は10mg/体重kg又は1~10mg/kgの範囲内、又は特定の実施態様では少なくとも1mg/kgであり得る。上記範囲の中間用量もまた本明細書に開示される範囲内であることが意図される。

【0150】

被験体は、毎日、一日置きに、毎週、又は実証的分析により決定されたいずれかの他のスケジュールに従ってこのような用量を投与され得る。例となる処置は、長期にわたって、例えば少なくとも6ヶ月の複数回投薬量での投与を伴う。さらなる例となる処置計画は、2週間ごとに1回又は1月に1回又は3~6ヶ月ごとに1回の投与を伴う。例となる投薬スケジュールは、連続した日に1~10mg/kg若しくは15mg/kg、一日置きに30mg/kg、又は毎週60mg/kgを含む。いくつかの方法において、異なる結合特異性を有する2つ又はそれ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、この場合、投与される各抗体の投薬量は示された範囲内であり得る。

【0151】

本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントは、多数の場合に投与され得る。単一の投薬間の間隔は、例えば、毎日、毎週、毎月または毎年であり得る。間隔はまた、患者におけるポリペプチド又は標的分子の血中レベルを測定することにより示されるように不規則であり得る。いくつかの方法において、投薬量は、特定の血漿抗体又は毒素濃度、例えば1~1000ug/ml又は25~300ug/mlを達成するように調整される。あるいは、抗体又はそのフラグメントは、徐放性製剤として投与され得、この場合、より少ない頻度の投与が必要である。投薬量及び頻度は、患者における抗体の半減期によって変わる。一般に、ヒト化抗体は、最も長い半減期を示し、続いてキメラ抗体及び非ヒト抗体である。一実施態様において、本明細書において開示される抗体又はそのフラグメントは、非結合体化形態で投与され得る。別の実施態様において、本明細書において開示される抗体は、結合体化形

態で複数回投与され得る。なお別の実施態様において、本明細書において開示される抗体又はそのフラグメントは、非結合体化形態で投与され、次いで結合体化形態で、又はその逆で投与され得る。

【0152】

投与の投薬量及び頻度は、処置が予防的又は治療的のどちらかによって変わる。予防的適用において、本発明の抗体又はそのカクテルを含有する組成物は、患者の抵抗性を増強するために、まだ疾患状態ではない患者に投与される。このような量は、「予防的有効用量」であると定義される。この使用において、この場合もまた正確な量は、患者の健康状態、及び全身免疫に依存するが、一般的には用量あたり0.1～25mg、特に用量あたり0.5～2.5mgの範囲に及ぶ。比較的低い投薬量が、長期間にわたって比較的低頻度の間隔で投与される。一部の患者は、彼らの寿命の残りの間処置を受け続ける。

10

【0153】

治療適用において、比較的短い間隔での比較的高い投薬量(例えば、用量あたり抗体約1～400mg/kg、放射性免疫複合体については5～25mgがより一般に使用され、より高い用量が細胞毒-薬物結合分子に使用される)が、疾患の進行が減少されるか又は終結するまで、そして特定の実施態様では、患者が疾患の症状の部分的又は完全な寛解を示すまで必要とされることがある。その後、患者は予防的養生法を施され得る。

【0154】

一実施態様において、被験体は、本明細書に開示されるポリペプチドをコードする核酸分子(例えば、ベクター中)で処置され得る。ポリペプチドをコードする核酸についての用量は、患者あたり約10ng～1g、100ng～100mg、1ug～10mg、又は30～300ug DNAの範囲に及ぶ。感染性ウイルスベクターについての用量は、用量あたり10～100又はそれ以上のウイルス粒子で変化する。

20

【0155】

治療剤は、予防的又は治療的処置のために、非経口的、局所的、静脈内、経口的、皮下、動脈内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内又は筋内の手段により投与され得る。筋内注射又は静脈内注入は、本明細書に開示される抗体の投与のために使用され得る。いくつかの方法において、治療抗体又はそのフラグメントは、頭蓋中に直接注入される。いくつかの方法において、抗体又はそのフラグメントは、徐放性組成物またはMedipadTMデバイスのようなデバイスとして投与される。

30

【0156】

本明細書に開示される薬剤は、場合により、処置を必要とする障害又は状態の処置(例えば、予防的又は治療的)において有効である他の薬剤と組み合わせて投与され得る。さらなる薬剤は、当該分野で認められ、特定の障害のために通常投与されるものである。

【0157】

本明細書に開示される90Y標識抗体の有効単回処置投薬量(すなわち、治療有効量)は、約5と約75mCiとの間の範囲に及び、そして一実施態様では、約10と約40mCiの範囲に及ぶ。131I標識抗体の有効単回処置非骨髄切除(non-marrow ablative)投薬量は、約5と約70mCiとの間の範囲に及び、そして一実施態様では、約5と約40mCiとの間の範囲に及ぶ。131I標識抗体の有効単回処置切除投薬量(Effective single treatment ablative dosages)(すなわち、自家骨髄移植を必要とし得る)は、約30と約600mCiとの間の範囲に及び、そして一実施態様では約50と約500mCi未満との間の範囲に及ぶ。キメラ改变抗体と併せて、マウス抗体と比べてより長い循環半減期のために、ヨウ素-131標識キメラ抗体の有効単回処置非骨髄切除投薬量は、約5と約40mCiとの間の範囲に及び、そして一実施態様では、約30mCi未満である。例えば、111In標識についての画像化基準は、典型的には約5mCi未満である。

40

【0158】

多くの臨床経験が131I及び90Yで得られたが、他の放射標識が当該分野で公知であり、そして類似した目的のために使用されてきた。なお他の放射性同位体が画像化のために使用される。例えば、本発明の範囲と適合するさらなる放射性同位体としては、限定されな

50

いが、¹²³I、¹²⁵I、³²P、⁵⁷Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁷⁷Br、⁸¹Rb、⁸¹Kr、⁸⁷Sr、¹¹³In、¹²⁷Cs、¹²⁹Cs、¹³²I、¹⁹⁷Hg、²⁰³Pb、²⁰⁶Bi、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、²¹²Pb、²¹²Bi、⁴⁷Sc、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹⁵³Sm、¹⁸⁸Re、¹⁹⁹Au、²²⁵Ac、²¹¹A、²¹³Biが挙げられる。この点において、アルファ、ガンマ、及びベータ放射体は、全て本発明に適合性である。さらに、本開示を考慮して、当業者は、どの放射性核種が選択された処置経過に適合するかを過度の実験をすることなく容易に決定することができると考えられる。この目的のために、臨床診断において既に使用されたさらなる放射性核種としては、¹²⁵I、¹²³I、⁹⁹Tc、⁴³K、⁵²Fe、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、の他に¹¹¹Inが挙げられる。抗体はまた、標的化免疫療法における可能性のある使用のための様々な放射性核種で標識されている(Peirersz et al. *Immunol. Cell Biol.* 65: 111、1987)。これらの放射性核種としては、¹⁸⁸Re及び¹⁸⁶Reの他により低い程度で¹⁹⁹Au及び⁶⁷Cuが挙げられる。米国特許第5,460,785号は、このような放射性同位体に関するさらなるデータを提供し、そして本明細書に参照により加入される。10

【0159】

以前に考察されたように、本明細書に開示される抗体又はそのフラグメントは、哺乳動物障害のインビボ処置のための薬学的有効量で投与され得る。この関連で、当然のことながら、開示された抗体又はそのフラグメントは、投与を容易にし、そして活性薬剤の安定性を増進するように製剤化される。特定の実施態様において、本発明に従う医薬組成物は、生理食塩水、非毒性緩衝液、保存料などのような薬学的に許容しうる非毒性の滅菌担体を含む。本出願の目的のために、治療剤に結合されるか又は結合されていない、本明細書に開示される抗体の薬学的有効量は、標的への有効な結合を達成し、かつ利益を達成するため、例えば疾患若しくは障害の症状を寛解するため、又は物質若しくは細胞を検出するために、十分な量を意味するように保持されるものとする。腫瘍細胞の場合、ポリペプチドは、特定の実施態様において、新生物又は免疫反応性細胞上の選択された免疫反応性抗原と相互作用することができ、そしてそれらの細胞の死滅の増加をもたらす。当然のことながら、本明細書に開示される医薬組成物は、薬学的有効量のポリペプチドを提供するために単回又は複数回用量で投与され得る。20

【0160】

本開示の範囲に沿って、本明細書に開示される抗体は、上述の処置方法に従って、治療効果又は予防効果を生じるために十分な量でヒト又は他の動物に投与され得る。本明細書に開示されるポリペプチドは、本明細書に開示される抗体を従来の薬学的に許容しうる担体又は希釈剤と公知の技術に従って混合することにより製造された従来の投薬形態でこのようなヒト又は他の動物に投与され得る。薬学的に許容しうる担体又は希釈剤の形態及び特徴は、混合しようとする活性成分の量、投与経路及び他の周知の変数によって決定されるということは当業者に認識されるだろう。当業者は、本発明に従う1つ又はそれ以上のポリペプチド種を含むカクテルが特に有効であるということを証明し得るということをさらに理解するだろう。30

【0161】

VI. PAI-1関連疾患又は障害を処置する方法

本明細書に開示される抗PAI-1抗体又はそのフラグメントは、PAI-1活性を拮抗するため有用である。従って、別の局面において、本発明は、それを必要とする被験体に、本明細書に開示される1つ又はそれ以上の抗PAI-1抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を投与することにより、PAI-1関連疾患又は障害を処置するための方法を提供する。40

【0162】

処置の影響を受けやすいPAI-1関連疾患又は障害としては、限定することなく、腎臓、肝臓若しくは肺線維症のような病態生理学的状態、又は腹部癒着形成が挙げられる。

【0163】

腹腔内癒着の発生は、ヒトの病気の主な原因である。癒着の合併症は、生命を脅かす腸閉塞ほど深刻になり得るが、慢性骨盤痛及び女性における不妊もまた腹膜癒着の一般的な続発症である。癒着の大部分は手術により生じるが、いくつかの場合には、炎症、子宮内50

膜症、化学性腹膜炎、放射線療法、異物反応、及び継続的な外来腹膜透析により引き起こされることも示された。腹膜損傷は、フィブリン沈着をもたらす局所炎症応答を引き起こす。組織プラスミノーゲン活性化因子(tPA)の減少並びにプラスミノーゲン活性化因子阻害剤PAI-1及びPAI-2の増加により引き起こされる腹膜線維素溶解活性における外傷後の機能不全は、沈着されたフィブリンを可能にして永久癒着へと組織化されると考えられている。

【 0 1 6 4 】

Seprafilm^(R)のような現在入手可能で有効な処置選択肢は、オープンアクセス(開腹術)においてのみ使用について制限を有し、開腹術で使用することができない。可能性のある処置の探索は継続している。

10

【 0 1 6 5 】

特定の例となる実施態様において、本明細書に開示される抗体は、腎線維症及び関連する急性腎損傷のほかに末期腎不全の主原因である慢性腎臓疾患を処置するために支給され得る。

【 0 1 6 6 】

当業者は、通常の実験により、どれほどの有効非毒性量の抗体(又はさらなる治療剤)がPAI-1関連疾患又は障害を処置する目的のためになるかを決定することができるだろう。例えば、ポリペプチドの治療活性量は、被験体の疾患状態(例えば、ステージI対ステージIV)、年齢、性別、医学的合併症(例えば、免疫抑制状態又は疾患)及び体重、並びに被験体において所望の応答を誘発する抗体の能力のような因子によって変化し得る。投薬計画は、最適な治療応答を提供するために調整され得る。例えば、いくつかの分割用量が毎日投与されてもよく、又は用量は、治療状況の緊急状態により示されるに従って比例的に減少されてもよい。しかし一般に、有効投薬量は、1日あたり体重1キログラムあたり約0.05~100ミリグラムの範囲、一実施態様では1日あたり体重1キログラムあたり約0.5~10ミリグラムの範囲であると期待される。

20

【 0 1 6 7 】

本明細書に開示される異なる局面及びそれらの実施態様は、互いに組み合わせができる。さらに、上記のこれらの局面及びそれらの実施態様のいずれも、本明細書以下に記載される特定の局面及び実施態様のいずれかと組み合わせができる。

【 0 1 6 8 】

30

本発明を説明するためにさらに役立ついくつかの特定の局面及び実施態様が以下に示される:

【 0 1 6 9 】

特定の局面及び実施態様の説明

項目1. (a) 重鎖フレームワーク領域及び重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域を含む];並びに

(b) 軽鎖フレームワーク領域及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号145を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む]

40

を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【 0 1 7 0 】

項目2. (a) 重鎖フレームワーク領域及び配列番号86を含む重鎖可変領域、並びに

(b) 軽鎖フレームワーク領域及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【 0 1 7 1 】

項目3. (a) 項目2の抗体の重鎖可変領域と少なくとも95%同一である重鎖可変領域、及び/又は

(b) 項目2の抗体の軽鎖可変領域と少なくとも95%同一である軽鎖可変領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

50

【0172】

項目4. 項目1の抗体と本質的に同じエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体。

【0173】

項目5. (a) 重鎖フレームワーク領域及び重鎖可変領域、[該重鎖可変領域は、配列番号34を含む重鎖CDR1領域、配列番号33を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号32を含む重鎖CDR3領域を含む]；並びに

(b) 軽鎖フレームワーク領域及び軽鎖可変領域、[該軽鎖可変領域は、配列番号37を含む軽鎖CDR1領域、配列番号36を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号35を含む軽鎖CDR3領域を含む]；
10

を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【0174】

項目6. 重鎖可変領域が配列番号6を含み、かつ軽鎖可変領域が配列番号7を含む、項目5に記載の抗体。

【0175】

項目7. 項目5に記載の抗体と本質的に同じエピトープに結合する、単離されたモノクローナル抗体。

【0176】

項目8. ヒトPAI-1に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、該抗体は：

(a) 配列番号82を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号91を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(b) 配列番号83を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号92を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(c) 配列番号84を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(d) 配列番号85を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号91を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；
30

(e) 配列番号85を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(f) 配列番号86を含む重鎖可変領域を有する、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号94を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(g) 配列番号87を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号95を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；
40

(h) 配列番号88を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号96を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(i) 配列番号89を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号97を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(j) 配列番号90を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号98を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(l) 配列番号86を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメン

10

20

30

40

50

ト、及び配列番号95を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；

(m) 配列番号89を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号93を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント；又は

(n) 配列番号89を含む重鎖可変領域を有する重鎖、若しくはその抗原結合フラグメント、及び配列番号95を含む軽鎖可変領域を有する軽鎖、若しくはその抗原結合フラグメント

を含む。

【0177】

10

項目9. (a) 配列番号22を含む重鎖CDR1領域、配列番号21を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号20を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号25を含む軽鎖CDR1領域、配列番号24を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号23を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

(b) 配列番号28を含む重鎖CDR1領域、配列番号27を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号26を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号31を含む軽鎖CDR1領域、配列番号30を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号29を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

(c) 配列番号40を含む重鎖CDR1領域、配列番号39を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号38を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号43を含む軽鎖CDR1領域、配列番号42を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号41を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

20

(d) 配列番号46を含む重鎖CDR1領域、配列番号45を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号44を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号49を含む軽鎖CDR1領域、配列番号48を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号47を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

(e) 配列番号52を含む重鎖CDR1領域、配列番号51を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号50を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号55を含む軽鎖CDR1領域、配列番号54を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号53を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

(f) 配列番号58を含む重鎖CDR1領域、配列番号57を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号56を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号61を含む軽鎖CDR1領域、配列番号60を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号59を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

(g) 配列番号64を含む重鎖CDR1領域、配列番号63を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号62を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号67を含む軽鎖CDR1領域、配列番号66を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号65を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域、

30

(h) 配列番号70を含む重鎖CDR1領域、配列番号69を含む重鎖CDR2領域、及び配列番号68を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号73を含む軽鎖CDR1領域、配列番号72を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号71を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域；又は

(i) 配列番号76を含む重鎖CDR1領域、配列番号75を含む重鎖CDR2領域、並びに配列番号74を含む重鎖CDR3領域を含む重鎖可変領域；並びに配列番号79を含む軽鎖CDR1領域、配列番号78を含む軽鎖CDR2領域、及び配列番号77を含む軽鎖CDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

40

【0178】

項目10. 項目8又は項目9のヒト化モノクローナル抗体とPAI-1上の本質的に同じエピトープに結合する、PAI-1に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【0179】

項目11. それを必要とする被験体に、薬学的有効量のPAI-1抗体を、経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、プラスミン生成を回復させる方法。

【0180】

項目12. 増加したレベルの線維化組織を含む状態を処置する、項目11に記載の方法。

50

【0181】

項目13. 状態が、線維症、皮膚線維症、全身性硬化症、肺線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、慢性肺疾患、肝線維症、腎線維症、慢性腎臓病、血栓症、静脈及び動脈血栓症、深部静脈血栓症、末梢肢虚血、播種性血管内凝固血栓症、血栓溶解を伴うか若しくは伴わない急性虚血発作、又はステント再狭窄である、項目12に記載の方法。

【0182】

項目14. PAI-1抗体が、項目1～10のいずれか1項に記載の抗体を含む、項目11、12又は13のいずれか1項に記載の方法。

【0183】

項目15. 増加したレベルのPAI-1又はPAI-1に対する増加した感受性に起因する状態を処置するための医薬の製造のための、薬学的有効量のPAI-1抗体の使用であって、患者に経口的に、注射用液剤により非経口的に、吸入により、又は局所的に投与することを含む、上記使用。

10

【実施例】

【0184】

本発明は、以下の実施例によりさらに説明され、これら実施例は、さらなる限定と解釈されるべきではない。配列表、図面並びに本出願全体を通じて引用される全ての参考文献、特許及び公開された特許出願は、参照により本明細書に明示的に加入される。

【0185】

さらに、本発明に従って、従来の分子生物学、微生物学、及び組み換えDNA技術が当該分野の技術範囲内で使用され得る。このような技術は、文献中に十分に説明されている。例えば、Sambrook、Fritsch & Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York(本明細書では「Sambrookら、1989」); DNA Cloning: A Practical Approach、Volumes I及びII(D.N. Glover編1985); Oligonucleotide Synthesis(M.J. Gait編1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins編(1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins編(1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney編(1986)]; Immobilized Cells And Enzymes[IRL Press、(1986)]; B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Inc. (1994)を参照のこと。

20

【0186】

実施例1: ハイブリドーマ生成: PAI-1タンパク質を用いたマウスの免疫及び抗体生成ヒト(h)及びカニクイザル(cyno)活性PAI-1(グリコシル化形態又は非グリコシル化形態)に対して交差反応性であり、かつPAI-1の阻害活性を中和してプラスミンの下流産生を回復し、それにより腎臓、肝臓若しくは肺線維症の処置のための有効な治療(therapeutic)又は腹部癒着形成及びケロイド瘢痕形成の予防となる抗体が開発された。モノクローナル抗体によるPAI-1阻害機能の中和は、3つの機構の分類に入ると記載されている:(1)立体障害によりtPA若しくはuPAに対してPAI-1をブロックする、(2)PAI-1を潜在(latent)コンホメーションへと変換する、又は(3)PAI-1を基質(substrate)コンホメーションへと変換する。

30

【0187】

a) 抗原

PAI-1は、ビトロネクチンに対するサブナノモル(subnanomolar)の親和性でのその結合により安定化された活性コンホメーションで細胞から分泌される。PAI-1は、37℃で数分以内、室温で数時間以内に活性コンホメーションから潜在コンホメーションへと自発的コンホメーション変化を受ける。ビトロネクチンに結合されると、PAI-1はコンホメーション変化により抵抗性となり、これにより活性コンホメーションのPAI-1の半減期が数分から数時間へと延長される。免疫された動物における活性コンホメーションPAI-1半減期を延長させるために、そしてマウス免疫系が活性PAI-1コンホメーションを認識するのを可能にするために、ビトロネクチン及びPAI-1の複合体を免疫化に使用した。

40

50

【0188】

昆虫細胞において産生されたヒトグリコシル化PAI-1を、Innovative Research(カタログ番号IGLYHPAI-A)から購入した。ビトロネクチン(カタログ番号IHVN)及びtPA(カタログ番号HTPA-TC)もInnovative Researchから購入した。免疫原を製造するために、PAI-1をビトロネクチンと1:1モル比で1時間室温にて、又はtPAと1:1モル比で15分間37℃にてインキュベートした。全ての免疫原を、滅菌食塩水を希釈剤として使用して準備した。

【0189】

b) 免疫化

当該分野で公知の標準的ハイブリドーマ製造プロトコルを実施して抗体を製造した。文献に以前に記載された標準的なアプローチは、PAI-1のみ又はPAI-1/tPA複合体を使用した。本発明者らは、代わりにPAI-1の活性コンホメーションに対する抗体を生成した。PAI-1/tPA複合体をPAI-1に対する抗体の生成への新しいアプローチとして使用した。抗体を生成するために、以下に概要を説明した三本の柱からなる方策を取った：

(1) 融合パートナーとしてマウス骨髄腫細胞株を用いた融合のためのマウス脾細胞を得てハイブリドーマを製造するための、PAI-1/tPA複合体を用いたマウスの古典的免疫化；

(2) 融合パートナーとしてマウス骨髄腫細胞株を用いた融合のためのマウス脾細胞を得てハイブリドーマを製造するための、PAI-1/tPA複合体を用いたマウスの古典的免疫化；及び

(3) 融合パートナーとしてマウス骨髄腫細胞株を用いた融合のためのマウス脾細胞を得てハイブリドーマを製造するための、PAI-1のみを用いたマウスの古典的免疫化。

【0190】

抗原(PAI-1のみ、Vn/PAI-1複合体、tPA/PAI-1複合体)あたり3匹のマウスを研究に使用した。これらのマウスは、9~20週齢無感作雌性BALB/cマウス(Charles River、系統コード028)であった。0日目に、9匹のマウスを、PAI-1単独、Vn/PAI-1又はtPA/PAI-1複合体を用いてリン酸緩衝化食塩水(PBS)中で腹腔内で免疫した。マウスあたり抗原合計10ugを、マウスあたり総体積200μlで1:1体積対体積比のSigma Adjuvant System (Sigmaカタログ番号6322)と混合した。14日目に、マウスを同じ量の抗原で追加免疫し、そして0日目と同じように準備した。21日目に、PAI-1特異的抗体価評価のために血液サンプルを採取した。PAI-1/tPA複合体で免疫したマウスは、PAI-1に対する非常に低い特異的反応性及び高い抗tPA力価を示し、そして下流融合には使用されなかった。

【0191】

51日目に、最も高い抗PAI-1特異的抗体価及びPAI-1が複合体化されたタンパク質(すなわち、Vn又はtPAのいずれか)に対して最も低い力価を有するがマウス及びラットPAI-1オルソログに対する最も高い力価を有するマウスを融合のために選択した。融合に選択したマウスを、上記のように、マウスあたり総体積200μlで1:1の比のSigma Adjuvant System(Sigmaカタログ番号6322)と混合したマウスあたり抗原合計10ugとしてPAI-1のみ又はPAI-1/Vn複合体でPBS中で追加免疫した。55日目に、マウスをCO₂チャンバにより屠殺し、血液を心臓穿刺により集め、そして脾臓をハイブリドーマ産生のために採取した。他の4匹のマウスは後の時点に同じ手順を受けた(最初のマウスを融合に使用した2~4ヶ月後)。

【0192】

血清滴定を、PAI-1のみ及びPAI-1/tPAについて3匹のマウスで、そしてPAI-1/Vnについて2匹のマウスで、実施例2に記載されるELISAプロトコルを使用して行った(結合ELISA)。

【0193】

【表7】

表3: PAI-1、PAI-1/Vn又はPAI-1/tPAで免疫されたマウスについての血清力価

免疫原	マウス番号	PAI-1に対する血清力価(OD ₄₀₅)		
		OD 1:100	OD 1:1000	OD 1:10000
PAI-1	1	2.1	1.9	1
PAI-1	2	2.1	1.4	1
PAI-1	3	2.0	1.4	1
PAI-1/Vn	2	2.15	1.5	1
PAI-1/Vn	3	1.7	1.25	1
PAI-1/tPA	1	1.2	0.8	0.3
PAI-1/tPA	2	1.3	0.9	0.7
PAI-1/tPA	3	1.3	0.9	0.5
NMS	n/a	0.4	0.12	0.07

NMS=正常マウス血清; n/a=該当なし
BioTek Synergy HT 機器を使用した OD₄₀₅

10

20

【0194】

PAI-1/tPA複合体で免疫されたマウスは、高特異的力価基準に達せず、融合には使用されなかった(表3)。表3に示される血清力価に基づいて、PAI-1に対して高い特異的力価を有する合計5匹のマウスを融合のために選択した。

【0195】

b) 融合

PAI-1に対して最も高い特異的力価を有する5匹のマウスを融合のために選択した。融合の日に、マウスをCO₂チャンバーで屠殺し、血液を心臓穿刺により集め、そして脾臓を取り出し、無血清ハイブリドーマ融合培地(IMDM; Iscoveの変法ダルベッコ培地500mL (HyClone SH30259.01)10mLを含有するペトリ皿に置いた。脾細胞を線維弹性膜から鉗子により絞り出し、そして無血清IMDM 10mLで2回洗浄した(初期スピンを含む)。

30

【0196】

細胞をCountess自動セルカウンターで計数した。次いで、融合パートナー細胞(骨髄腫: F0(ATCC 参照CRL-1646))及び脾細胞を1つの50mLチューブで1:2~1:10(細胞数)の比で混合し、そして970rpmで10分間(低速スピン)遠心沈殿させて軟らかいペレットを形成した。75mM Hepes 50%質量/体積、Rocheカタログ番号783641(10783641001)中の予熱した(37°C)1mL PEG(PEG 1500)を1分間にわたって細胞ペレットに1滴ずつ滴下し、そして細胞をPEGの液滴を加えるごとに混合した。ペレットをPEGとともにさらに1分間インキュベートし、繰り返して、10のうち最初の1mLが30秒間にわたって加えられるように無血清IMDM培地10mLを1分間にわたって加えた。生存能を保存するために細胞を10分間970rpmで低速スピンにかけた。融合した細胞を96ウェルプレートに選択培地(200mL Gibco Hybridoma (SFM 番号12045)、20mL 10% HyClone SuperLow IgG Defined FBS(番号SH30898.03)、2mLペニシリン/ストレプトマイシン、4mL(ハイブリドーマ融合及びクローニング栄養補助剤(Roche Diagnostics 11 363 735 001 (50X))及びHAT 4mL(ヒポキサンチン-アミノブテリン-チミジン)(Sigma-Aldrich 番号H0262(50X))中200uLでプレーティングした。約10~14日後、又はウェル中の培地が黄色に変わったときに融合はスクリーニングの準備が整った。次いで発生したハイブリドーマからの上清を、PAI-1及びPAI-1/Vn複合体に結合している抗体の存在についてELISA(実施例2)により試験した。

40

【0197】

実施例2: PAI-1-ビトロネクチン複合体に対する特異性についてのハイブリドーマ上

50

清スクリーニングのための結合ELISA

選択された5匹のマウスの脾臓からの各融合は、第一段階一次スクリーンとしてPAI-1/Vn複合体への結合についてスクリーニングする必要がある約5000クローニ生じた。ハイブリドーマ上清の一次スクリーニングを、PAI-1又はPAI-1-ビトロネクチン複合体のいずれかに対してELISAを使用して並行して行い、ビトロネクチンに複合体化したPAI-1に特異的に結合するハイブリドーマを選択した。ELISAに使用した材料は以下である: Immulon 4 HBX ELISAプレート(Dynax カタログ番号N0541216);ヒトモノマービトロネクチン 5ug/ml (Innovative Research カタログ番号IHVN);グリコシル化ヒトPAI-1(活性形態)(Molecular Innovations カタログ番号GLYHPAI-A);いくつかの融合の非グリコシル化マウスPAI-1(Molecular Innovations カタログ番号MPAI-A);HRP-ヤギ抗マウスIgG(H+L)である二次抗体(Jackson ImmunoResearch Labs 番号115-035-166);及びABTS基質:Roche Diagnostics(番号11 204 521 001)。

【0198】

使用した対照抗体は:

- a) 33B8、PAI-1に対するマウスモノクローナル阻害抗体(IgG1; Innovative Research カタログ番号IMA-33B8);
- b) 33H1、PAI-1に対するマウスモノクローナル阻害抗体(IgG1; Innovative Research カタログ番号IMA-33H1);
- c) 31C9、PAI-1に対するマウスモノクローナル非阻害抗体(IgG1; Innovative Research カタログ番号IMA-31C9);及び
- d) 1B7.11、IgG1アイソタイプ対照抗体(抗TNP mAb-ATCC(カタログ番号TIB-191)から購入したハイブリドーマ細胞株から自社で製造

であった。

【0199】

ELISA法は以下のとおりであった:PBS中5ug/ml Vnで終夜4にて50ul/ウェルでコーティングされたプレート;翌日、プレートを1時間200ul PBS (BSA/PBS)中1%ウシ血清アルブミンでプロックした;プレートを200ul/ウェルPBSで4回洗浄した;1%BSA/PBS中2ug/mlの活性PAI-1をプレートに50ul/ウェルで加え、そして1時間インキュベートした;プレートを200ul/ウェルPBSで4回洗浄した;1%BSA/PBS中の抗体希釈物又は、元の96ウェルプレートからのハイブリドーマ上清をELISAプレートに50ul/ウェルで加えた;プレートを1時間室温(RT)でインキュベートした;プレートを200ul/ウェルPBSで4回洗浄した;1%BSA/PBS中のHRP-抗マウスIgG 50ul 1:2000を加え、そして1時間室温でインキュベートした;プレートを200ul/ウェル PBSで4回洗浄した;ABTS基質(1つの丸剤を5mlに溶解)を50ul/ウェルでプレートに加え、次いでプレートをBioTek Synergy HT機器でOD₄₀₅を使用して読み取った。結合ELISAにおける抗体滴定のための典型的標準曲線を図2に示す。抗体31C9、33B8及び33H1は陽性対照としての役目を果たし、そしてIgG1は陰性対照としての役目を果たした。表4は、生成された約5000のクローニのうち、675クローニがPAI-1及びPAI-1/Vnの両方への結合について陽性であったことを示す。次いでこれらのクローニをPAI-1親和性についてスクリーニングした。

【0200】

10

20

30

40

【表8】

表4: PAI-1 及びPAI-1/Vn の両方への結合について陽性のクローンの数

融合	免疫原	マウス数	PAI-1 及びPAI-1/Vn の両方への結合について陽性のクローンの数
A	PAI-1/Vn	2	131
B	PAI-1	2	146
C	PAI-1/Vn	3	145
D	PAI-1	3	104
E	PAI-1	1	149

10

【0201】

実施例3：親和性ランク付けによるハイブリドーマ上清のBiacoreスクリーニング
低いオフレート(off-rate)を有する高親和性抗体のさらなる選択をBiacoreにより行った。Biacoreハイブリドーマ上清スクリーニングを:(1)抗マウス固定化抗PAI-1抗体を使用する逆スクリーニング、又は(2)遊離PAI-1をリガンドとして若しくは固定化Vnに対して使用する順(forward)スクリーニングアッセイ

使用した機器は、実時間での生体分子相互作用分析(BIA)のために設計されたBIACORE 2000又はBIACORE 3000(GE Healthcare)であった。使用したセンサーチップは、表面上にカルボキシメチル化デキストランマトリックスを有するCM5チップ(GE Healthcare)であった。各センサーチップは4つの平行なフローセル(Fc)を有していた。全てのフローセルを、チップ製造についての製造者のプロトコルに従って標準的なアミンカップリングにより抗マウスIgG Fc mAbとカップリングした。

20

【0202】

Biacore逆スクリーニングアッセイにおいて、ELISA陽性ハイブリドーマ上清を選択し、そして0.2 μmフィルターに通してろ過した後、Biacoreチップ表面に注入した。各ハイブリドーマ上清を、フローセルFc2～Fc4のうちの1つのフローセル上に注入し、そしてハイブリドーマ上清中のIgGは、抗マウスIgG Fc mAbによりチップ表面に捕捉されただろうが、Fc1は参照細胞上にそのまま残っていた。次いでPBS中のヒトPAI-1タンパク質をFc1～Fc4に注入した。PBS緩衝液もまたブランクとしてチップ表面に注入した。Fc1及びブランク緩衝液実行のシグナルを差し引いた後、上清からの抗体のPAI-1タンパク質に対する結合親和性(KD) / 解離速度(kd)を分析し、そしてScrubber 2ソフトウェアを使用してランク付けした。

30

【0203】

Biacore順スクリーニングアッセイにおいて、精製されたヒトビトロネクチンタンパク質をCM5チップフローセルFc1～Fc4に固定した。ヒト又はカニクイザルPAI-1を全てのフローセル上に捕捉した。次いでろ過した選択されたハイブリドーマ上清を、Fc1を除いてフローセルあたり1つの捕捉されたPAI-1上に注入し、Fc1は参照フローセルとして保存した。PBS緩衝液もブランクとしてチップ表面上に注入した。Fc1及びブランク緩衝液実行のシグナルを差し引いた後、ハイブリドーマ上清中の抗体のビトロネクチン捕捉PAI-1に対する結合親和性を、Scrubber 2ソフトウェア(バージョン2.0a、2005; BioLogic Software、BioLogic Software Rty Ltd.、116 Blamey Court、Campbell、ACT 2612 Australia)を使用して分析しランク付けした。

40

【0204】

表5は、融合A、B、C、D及びEからの陽性及び陰性抗体クローンの選択を示す。多数の抗体がスクリーニングされたため、全てのデータが示されているとは限らない。ヒト及びカニクイザルPAI-1タンパク質に対する優れた($kd < 10^{-4}$ 1/秒)結合解離速度を示した抗体クローンのみを、機能的発色アッセイのために選択した。

【0205】

50

【表9】

表5: Biacore アッセイにおけるヒト PAI-1 へのハイブリドーマ上清結合親和性/オフレートスクリーニング

クローニ	hPAI-1への結合		カニクイ ザル PAI-1	クローニ	hPAI-1への結合		カニクイ ザル PAI-1
	結合	オフレート $\leq 10^{-4}$			結合	オフレート $\leq 10^{-4}$	
A9	ND	ND	ND	C26	+	-	-
A20	+	-	-	C45	+	+	+/-
A37	+	-	-	C46	+	+	+
A39	+	+	-	C49	+	+/-	ND
A41	ND	ND	ND	C61	+	+/-	+/-
A44	+	+	+	C66	+	-	-
A47	+	+	+	C69	+	+	+/-
A52	ND	ND	ND	C76	ND	ND	ND
A71	+	+	+	C79	+	-	-
A75	+	+/-	+/-	C85	ND	ND	ND
A83	+	+/-	-	C109	+	-	-
A89	+	+/-	-	C118	+	+/-	ND
A93	+	+/-	-	C134	ND	ND	ND
A98	+	-	-	C145	+	-	+/-
A99	+	+	+/-	D4	-	-	-
A105	+	+	+	D12	+	-	-
A107	+	-	-	D13	-	-	ND
A113	+	+	+	D15	-	-	ND
A119	+	+/-	+/-	D31	+	-	-
B16	ND	ND	ND	D33	+	+/-	-
B18	+	-	-	D37	+	-	-
B28	+	+	-	D48	+	+	+/-
B29	+	-	-	D52	+	+	+
B32	+	+	+	E4	+	+	-
B58	+	+	-	E5	+	+	-
B85	ND	ND	ND	E11	+	+	-
B89	+	+	+/-	E16	+	+	+/-
B99	+	-	+/-	E20	+	ND	ND
B105	+	+	+/-	E21	+	+	-
B109	+	+	+				
B118	ND	ND	ND				

“+” = h/cPAI-1 への陽性結合又は 10^{-4} に等しいか若しくはそれ以下のオフレートを表す“+/-” = h/cPAI-1 への部分的結合又は 10^{-4} よりわずかに高いオフレートを表す“-” = h/cPAI-1 に対する低い結合若しくは無結合又は 10^{-4} より高いオフレートを表す

ND = 未決定

【0206】

実施例4: PAI-1のtPAとの相互作用をブロックする抗体を選択するためのハイブリドーマ上清スクリーニングのための機能性ELISA

機能性抗体の選択を可能にするために、新しいELISAを、PAI-1に結合するだけの抗体を、tPA阻害剤としてPAI-1の機能をブロックした抗体(機能性ELISA)に対して識別することを可能にするために開発した。

10

20

30

40

50

【0207】

ハイブリドーマ上清を、tPA-PAI-1相互作用をブロックする能力を有する異なるクローニーのハイブリドーマ上清を同定するために、新しい機能性ELISAでスクリーニングした。機能性ELISAの設計は以下のとおりである:(1)抗体がPAI-1に結合するが、抗体結合はPAI-1とtPAとの間の共有結合の形成をブロックしない場合、その抗tPA抗体は、PAI-1を通じてプレートに結合したtPAに結合し、そして陽性記録を生じる;(2)抗体がPAI-1をブロッケし、それによりPAI-1コンホメーションを変化させるか又は立体障害のいずれかによりtPA相互作用をブロックする場合、その抗tPA抗体はプレートに結合することができず、記録は陰性(より低いOD₄₀₅)である。並行して、ハイブリドーマ上清を、実施例2に記載されるELISAにおいてPAI-1に対する結合について試験した。ハイブリドーマ上清中の抗体の量は未知であるので、対照記録より低いもの(すなわち、アイソタイプ対照記録より低い)は、目的の抗体の同定とみなされた。上清中の変化する抗体濃度に起因して、いくつかの場合のブロッキングは部分的にしかなかった。 10

【0208】

ストレプトアビジン被覆プレート(NUNC 番号436014)を、1% BSA/PBS中50ul/mlの2ug/mlビオチン-PAI-1(N-末端ビオチン標識活性フラクションを有するヒトPAI-1;Molecular Innovations カタログ番号NTB10PAI-A)とともに室温(RT)で2時間インキュベートした。プレートを1時間200ul 1%BSA/PBSでRTにてブロッケし、そして200ul/ウェル PBSで4回洗浄した。精製された抗体希釈物及びハイブリドーマ上清を、50ul/ウェルでウェルに加え、そして15分間インキュベートした。プレートを200ul/ウェル PBSで4回洗浄した。二本鎖tPA(Innovative Research カタログ番号HTPA-TC)を1ug/mlでプレートに50ul/ウェルで加え、そして30分間RTでインキュベートした。プレートを200ul/ウェル PBSで4回洗浄した。抗tPA HRP結合体化抗体(Life Span Technologies、カタログLS-C39721)を1:3000希釈でプレートに加え、そして45分間インキュベートした。プレートを200ul/ウェル PBSで4回洗浄した。ABTS基質(5ml中に1つの錠剤を溶解;Roche Diagnostics 番号11 204 521 00 1)を50ul/ウェルでプレートに加え、そして発色のための時間を取った。プレートをBioTek Synergy HT機器でOD₄₀₅を使用して読み取った。IgGアイソタイプ対照より低い値のODはPAI-1へのtPA結合のブロッキングを示す。 20

【0209】

いくつかの場合、機能性ELISAは、Biacore上清スクリーニングの前に行われ、そしてハイブリドーマ開発により重要である選択工程の役割を果たす。陽性対照として33H1、陰性対照としてIgG1及び同定された陽性抗体クローニーとしてA44を用いた代表曲線を図3に示す。 30

【0210】

【表10】

表6: PAI-1 の tPA との相互作用をブロックする抗体を選択するためのハイブリドーマ
上清スクリーニングのための機能性ELISA

クローン	PAI-1 ELISA	tPA/PAI-1 結合阻害	選択	クローン	PAI-1 ELISA	tPA/PAI-1 結合阻害	選択
A9	+	-	無	C26	+	+	有
A20	+	-	無	C45	+	+	有
A37	+	+	有	C46	+	-	無
A39	+	+/-	有	C49	+	-	無
A41	+	+	有	C61	+	+	有
A44	+	+	有	C66	+	+	有
A47	+	+	有	C69	+	+	有
A52	+	-	無	C76	+	-	無
A71	+	+	有	C79	+	+	有
A73	+	-	無	C85	+	-	無
A75	+	+	有	C109	+	+	有
A83	+	+	有	C118	+	+	有
A89	+	+	有	C134	+	-	無
A93	+	-	無	C145	+	+	有
A98	+	+	有	D4	+	-	無
A99	+	-	無	D12	+	+	有
A105	+	+	有	D13	+	+	有
A107	+	+	有	D15	+	+	有
A113	+	+	有	D31	+	+	有
A119	+	+	有	D33	+	+	有
B16	+	-	無	D37	+	+	有
B18	+	+	有	D44	+	+	有
B28	+	+/-	有	D47	+	+	有
B29	+	+	有	D48	+	+	有
B32	+	+	有	D52	+	+	有
B58	+	+	有	D55	+	+	有
B85	+	-	無	E4	+	-	無
B89	+	+	有	E5	+	-	無
B99	+	+	有	E11	+	+	有
B105	+	+	有	E16	+	+	有
B109	+	+	有	E20	+	-	無
B118	+	+	有	E21	+	+	有

PAI-1 ELISA = “+”はPAI-1への結合を表す(実施例2を参照のこと)

tPA/PAI-1 結合阻害= “+”スコアは tPA の PAI-1 との相互作用が阻害されることを表す; +/− = tPA の PAI-1 との相互作用の部分的阻害

【0211】

200超の上清をスクリーニングした。表6は陽性及び陰性ハイブリドーマ上清の選択を示す。融合あたり約10のハイブリドーマが、機能性ELISAにおいてtPAへのPAI-1の結合をブロックする能力を示した。ハイブリドーマ上清からのデータに基づいて、ハイブリドーマを配列決定及び中規模抗体製造のために選択した。D4は非グリコシル化PAI-1に十分に結合しなかったが、これはグリコシル化PAI-1へのそのBiacore結合に基づいて精製及び配列

10

20

30

40

50

決定のために選択された。精製された抗体を、親和性動力学についてBiacoreで、そして市販の抗体と比較した効力について発色及び細胞アッセイにおいてさらに特徴付けした。

【0212】

実施例5：5'-RACE(cDNA末端の高速増幅)による配列決定及びマウス抗体精製

一連の融合から精製された特異的標的に対する抗体は同じ配列を有し得る。抗体生成の初期段階で抗体遺伝子配列決定を行うことにより、いずれかの重複した可能性のある抗体を除去し、そして正確な抗体遺伝子配列が抗体選択及びヒト化さらにはキメラ抗体構築を導いた。

【0213】

5'-RACEは、mRNAの3'末端又は5'末端での規定された中間部位と未知の配列との間のメッセージRNAテンプレートからの核酸配列の増幅のための手順である。この片側(single-sided)特異性を用いた増幅の方法論は、「片側(one-sided)」PCR又は「固定(anchored)」PCRとして記載されている。リード抗体の元の可変マウス抗ヒトPAI-1抗体配列を、5'-RACE cDNA配列決定により決定し、そしてN末端タンパク質配列決定により確認した。

【0214】

可変重鎖(VH)及び軽鎖(VL) IgG配列を決定するために、ハイブリドーマ細胞からの総RNAを、RNeasyミニキット(QIAGEN、カタログ番号74104)を使用して製造者の指示に従って単離した。手短には、細胞(5×106細胞)を、キットのRLT緩衝液350ulに溶解し、続いてスピンカラム上に総RNAを捕捉した。RNAをキットのTE緩衝液で溶出し、氷上で貯蔵した。

【0215】

第一の鎖のcDNAを、SMARTer™ RACE cDNA増幅キット(Clontech、カタログ番号634923)を使用して製造した。5'-RACEプロトコルを、製造者の指示に従って実行した。VH及びVL鎖cDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりSMARTer™キットで供給される5'-プライマー並びに以下に記載される3' VH及びVL遺伝子特異的プライマーを使用して別々に増幅した：

重鎖3'-プライマー：5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA-3' (配列番号105)

軽鎖3'-プライマー：5'-CTCATTCCCTGTTGAAGCTCTTGAG-3' (配列番号106)

【0216】

増幅されたVH及びVL遺伝子を、TOPO TAクローニングキット(Invitrogen、カタログ番号K4520-01)を使用してTOPOベクターに別々にクローンした。これらの手順を製造者の指示に従って実行した。細菌を形質転換するために、反応混合物をコンピテントなE. coli細胞に加え、そして氷上で20分間インキュベートした。E.coli細胞及び反応混合物の入ったチューブを、42℃で40秒間加熱し、そしてリット(lit)のSOC培地250マイクロリットルを加えた。E.coliを37℃で60分間振盪しながら300rpmでインキュベートした後、細菌を、1mlあたり100マイクログラムのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上に広げ、続いて37℃で終夜インキュベートした。

【0217】

挿入されたVH及びVL遺伝子のPCRによる確認の際に、5つの細菌クローンを選択し、そしてプラスミドDNA製造のために1mlあたり100マイクログラムのアンピシリンを含有するLB培地で増殖させた。プラスミドDNAを、QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN、カタログ番号27104)を使用して製造者の指示に従って単離した。ハイブリドーマのVH及びVL IgG遺伝子をSanger法により配列決定し、そしてCDRを接觸(Contact)定義(MacCallumら)を使用して決定した。

【0218】

モノクローナル抗体をCELLlineバイオリアクターフラスコ(Wilson Wolf Manufacturing Corp.;カタログ番号CL350又はカタログ番号CL1000)において製造者の指示に従って無血清培地(Gibcoカタログ番号12045)で製造し、そしてプロテインA/Gクロマトグラフィー(GE Healthcare Life Sciences、カタログ番号28-4083-47及び28-4082-53)により精製した。精製した抗体を、Biacoreで親和性動力学についてさらに特徴づけし、そして発色及び細胞

10

20

30

40

50

アッセイにおいて市販の抗体と比較した効力について特徴づけした。

【0219】

実施例6：精製した抗体を使用する機能性発色アッセイ

精製した抗体を、PAI-1をブロックする能力について発色アッセイで試験した。PAI-1はtPA機能を阻害し、従って、PAI-1をブロックする抗体はtPA機能の回復を生じるだろう。発色アッセイは、1つ又はそれ以上のペプチド結合を加水分解することによりそれらの天然の基質（タンパク質及びペプチド）に作用するタンパク質分解酵素を利用する。この方法は、通常は、特定のアミノ酸に隣接するペプチド結合のみが切断されるという意味で高度に特異的である。発色基質は、タンパク質分解酵素と反応して定量可能な色の形成を生じるペプチドである。発色基質は合成により製造され、そして酵素の天然基質の選択性と類似した選択性を有するように設計される。酵素切断後に放出された場合に色を生じる化学基が発色基質のペプチド部分に結合される。色の変化は分光測定で追跡することができ、そしてタンパク質分解活性に比例する。

【0220】

発色アッセイを使用して、tPA阻害剤としてPAI-1機能を中和する抗体の能力を確認した。tPAは発色基質S2288からpNAを放出することができる。溶液中のS228は無色であるが、tPAへの曝露及びその後のpNAの放出後、溶液はOD₄₀₅で読み取ることができる黄色を生じる。色形成を2~3時間にわたって観察し、酵素反応の動力学を決定することができる。PAI-1は濃度依存性様式でtPAの酵素活性をブロックし得る。

【0221】

2段階発色アッセイを行った。全ての試薬は、それらが基質溶液に加えられる段階まで10x濃度であった。第一の段階において、tPA阻害におけるPAI-1の効力を、発色アッセイ（固定tPA濃度を用いたPAI-1滴定）を使用して測定した。PAI-1滴定曲線を分析してtPA活性をブロックするPAI-1についてのIC₅₀を決定した。その後、曲線から計算したIC₈₀を、PAI-1ブロッキング機能を中和しtPA酵素活性を回復する能力についてのさらなる抗体照合のために選択した。等体積(25uL)のtPA(14nM)(Innovative Research、カタログ番号IHTPA-T C)及びグリコシル化(活性形態)ヒトPAI-1(Molecular Innovations、カタログ番号GLYHPA I-A)又は非グリコシル化(活性形態)マウスPAI-1(Molecular Innovations カタログ番号IM PAI)を混合し、そして108nMで開始したPAI-1の3倍段階希釈及び固定濃度のtPAを使用してインキュベートした。全てのタンパク質希釈を1%BSA/PBSで作製した。混合物を96ウェルマイクロタイタープレートのウェルで15分間室温でインキュベートした。次いで、製造者の指示に従って希釈した200uL発色基質S2288(1.25mM)(Chromogenix、カタログ番号S-820852)をウェルに加え、そして2時間にわたる10分毎の405nmでのOD₄₀₅吸光度変化を記録して残留tPA活性を測定した。対照のために、バックグラウンドをtPAの不在下で測定し(酵素反応無し)、陽性対照はPAI-1無し(100% tPA活性)であり、そして陰性対照はtPAの10倍過剰のPAI-1であった(tPA活性の完全なブロック)。33B8、A44、33H1及びIgG1についての代表的な曲線については図4を参照のこと。

【0222】

第二工程のために、抗体の機能特性を、活性PAI-1を阻害してtPA機能を回復するそれらの abilities をPAI-1中和アッセイを使用して評価することにより決定した。この工程のために、活性PAI-1 12.5uL(56nM)を、等体積の、1% BSA(Sigma、カタログ番号A3059)を含有するPBS(Invitrogen、カタログ番号14190-144)又は2uMで開始した抗体の段階3倍希釈のいずれかとともにインキュベートした。対照及び未知の抗体を、3nM PAI-1及びtPAを混合物に加えて、0.1~300nMの範囲に及ぶ濃度(5倍希釈)でインキュベートした。全ての成分を10倍濃度で室温にてインキュベートし、そしてさらに、tPAによる切断の際に透明から黄色へと変色するtPA基質S2288で10倍希釈した。サンプルをOD 405で2時間10分ごとに37度読み取った。この混合物を、抗体-抗原複合体形成を達成するために、96ウェルマイクロタイタープレートのウェル中で30分間室温にて反応させた。次いで、tPA 25uL(tPA活性のIC₈₀に対応する14nM)をウェルに加え、そして15分間室温でインキュベートした。最後に、製造者の指示に従って希釈した200uL 1.25mM基質S2288をこの混合物に加えた

10

20

30

40

50

。405nmにおける吸光度変化を記録して、残留tPA活性を2時間10分毎に測定した。100パーセントPAI-1活性を、抗体の存在しない場合に観察されたPAI-1活性として定義する。抗体によるPAI-1活性の中和を、抗体の存在下で測定された残留PAI-1活性から計算した。対照は、アイソタイプ対照（陰性）としてのIgG1並びに陽性対照としての33H1 mAb及び33B8 mAbであった。B28、E16、E21、A75及びIgG1についての代表的な曲線については図5を参照のこと。

【0223】

ヒトtPAを阻害するヒトPAI-1のオルソログを、2段階発色アッセイシステムにおいて試験した。オルソログの滴定を、ヒトPAI-1について上に記載されるように行い(滴定の代表的曲線については図6を参照のこと)、そしてtPA活性を発色法により決定した(カニクイザル及びマウスPAI-1に対する33B8及びA44についての代表的曲線については図7を参照のこと)。アッセイにおいて使用したヒトtPAの最終濃度は1.4nMであった。12.5ul活性PAI-1(56nM)を、等体積の、1%BSA含有PBS又は2uMで開始した抗体の段階3倍希釈のいずれかとともにインキュベートした。この混合物を96ウェルマイクロタイプレートのウェル中で30分間室温にて反応させた。次いで、tPA(14nM)25ulをウェルに加え、そして15分間室温でインキュベートした。反応を終わらせるために、200ul tPA基質S2288(Chromogenix) (1.25mM)を混合物に加えた。オルソログPAI-1はMolecular Innovationsから入手した:マウスPAI-1(野生型活性フラクション;カタログ番号MPAI);ラットPAI-1(野生型活性フラクション;カタログ番号RPAI);及びウサギPAI-1(安定変異体;カタログ番号RbPAI-191L)カニクイザルPAI-1(活性カニクイザルPAI-1)をE.coliにおいて自家製造した。Biacoreスクリーニングにおけるウサギ及びラットオルソログの不十分なオフレート(データ示さず)のために、これらのオルソログに対する抗体のスクリーニングは行わなかった。

【0224】

【表 1 1】

表7: 機能性発色アッセイにおけるオルソログに対する抗体の活性及びPAI-1の
グリコシル化状態

クローン ID	アイソタイプ	PAI-1 オルソログ及びグリコシル化状態			
		非グリコ シル化 hPAI-1	グリコ シル化 hPAI-1	非グリコ シル化 cPAI-1	非グリコ シル化 mPAI-1
A37	IgG1	+/-	-	-	-
A39	IgG1	-	+++	-	-
A41	IgG1	+/-	-	-	-
A44	IgG1	+++	+++	+++	-
A47	IgG1	nd	-	-	-
A71	IgG1	+++	+++	+++	-
A75	IgG2a	+++	+++	+++	-
A83	IgG1	nd	+/-	+/-	-
A89	IgG2b	-	-	-	-
A98	IgG1	nd	nd	nd	nd
A105	IgG1	+++	+++	+++	-
A107	IgG1	+/-	-	-	-
A113	IgG1	-	-	-	-
A119	IgG2a	-	-	-	-
B18	IgG1	+	+	+	-
B28	IgG2b	-	+++	-	-
B29	IgG1	-	-	-	-
B32	IgG1	nd	-	-	-
B58	IgG1	nd	+	+	-
B89	IgG1	nd	-	-	-
B99	IgG2a	nd	+	+	-
B105	IgG1	-	-	-	-
B109	IgG1	+++	+++	+++	-
B118	IgG1	+	+	+	-
C26	IgG1	++	++	++	+
C45	IgG2b	+++	+++	+++	-
C61	IgG1	+	+	+	-
C66	IgG1	+	+	+	-
C69	IgG1	++	++	++	-
C79	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C109	IgG2b	+/-	+/-	+/-	-
C118	IgG1	++	++	++	-
C145	IgG2b	++	++	++	-

10

20

30

40

【0225】

【表12】

D4	IgG2a	+	++	+	-
D12	IgG1	+	+	+	-
D13	IgG1	-	-	-	-
D15	IgG1	+	+	+	-
D31	IgG1	++	++	++	-
D33	IgG1	-	-	-	-
D37	IgG2a	-	-	-	-
D48	IgG2a	-	+/-	-	-
D52	IgG1	+	+	+	-
E11	IgG1	++	++	++	-
E16	IgG1	+++	+++	+++	-
E21	IgG2b	+++	+++	+++	-

h=ヒト、c=カニクイザル、m=マウス、nd=未決定
“-”=活性無し“+/-”=部分的活性、“+”わずかな活性、“++”=中程度の活性、“+++”=強い活性

【0226】

各融合からの1つ又はそれ以上の抗体は、このアッセイにおいてカニクイザル(c_{yno})及びヒトPAI-1阻害機能の両方をブロックする能力を示し、約14の抗体は中程度から強いブロッキング活性を有していた。A39及びB28は、これら2つの抗体がグリコシル化hPAI-1をブロックしたがヒト又はカニクイザル非グリコシル化PAI-1に対して活性を有していなかったという点で独特のプロフィールを有していた。C26を除いて抗体はどれもマウスPAI-1活性を有效地にブロックすることができなかった(ヒトPAI-1の10倍以内)。

【0227】

実施例7: モノクローナル抗体についての作用機構

モノクローナル抗体は、3つの異なる機構によりPAI-1を阻害することができる:a)立体障害により、b)結合の際にPAI-1を潜在コンホーメーションへと変換することにより、及びc)阻害剤の代わりにtPAコンホーメーションの基質へとPAI-1を変換することにより(「基質コンホーメーション」)。PAI-1はセリンプロテアーゼとの相互作用の際にtPAと共有結合する。

【0228】

発色アッセイ及びSDS-PAGE技術を、抗体作用機構を同定するために使用した。モノクローナル抗体(又は対照抗体)、PAI-1及びtPAの間の反応を、機能性発色アッセイのために上記のように行なった。サンプルをLaemmliサンプル緩衝液と混合し、そして非還元条件下でSDS-PAGEゲル上にロードし、そして30分間実行した。その後、ゲルをクーマシーブルーで染色してタンパク質、複合体及びPAI-1の切断形態を可視化した。公知の作用機構を有する対照モノクローナル抗体を比較器(comparators)として使用した。33B8はPAI-1を潜在コンホーメーションへと変換することが知られており、そして33H1はPAI-1を基質コンホーメーションに変換することが知られている。このアッセイは、基質コンホーメーションを確実に同定し得るが。潜在コンホーメーション又は立体障害を区別することができない。代表的なSDSゲルを図8、9及び10に示す。

【0229】

【表13】

表8: モノクローナル抗体の作用機構

抗体	作用機構
A44	PAI-1 を活性→基質コンホメーションに変換
C26	PAI-1 を活性→基質コンホメーションに変換
C45	PAI-1 を活性→基質コンホメーションに変換
E21	PAI-1 を活性→基質コンホメーションに変換
A39	PAI-1 を活性→潜在コンホメーションに変換又は立体障害
B109	PAI-1 を活性→潜在コンホメーションに変換又は立体障害
E16	PAI-1 を活性→潜在コンホメーションに変換又は立体障害

10

【0230】

A44、C26、C45及びE21は、PAI-1形態 活性コンホメーションを基質コンホメーションに変換することによりPAI-1活性をブロックする。A39及びB109は、異なる作用機構を有するが、アッセイは、これらの抗体がPAI-1を活性コンホメーションから潜在コンホメーションに変化させることによりPAI-1活性をブロックするのか立体障害によりブロックするのかを区別することができなかった。

20

【0231】

実施例8：精製された抗体結合動力学

動力学測定において、抗体を逆に25で評価した。逆アッセイにおいて、PAI-1抗体を、CM5チップ上に準備された抗マウスIgG Fc抗体に捕捉させ、続いて40nMで始めてPAI-1タンパク質(ヒト又はカニクイザル)の段階2倍希釈を行う。大量輸送制限を避けるために高流量を選択した。2000秒間を解離時間にとって選択した抗体の遅いオフレートに適応させた。抗体 - PAI-1結合の各回の後にチップをグリシン-HCl、pH1.7緩衝液により再生させた。動力学データ分析を、Biacore BIAevaluationソフトウェアを使用して行った。センサーグラム (sensorgrams) を、参照フローセル値及びプランク緩衝液値を差し引くことにより二重参照した。センサーグラムを、局所R_{max}を用いたシミュレートした動力学 (simulated kinetics) 1:1(Langmuir)モデルを使用することによりフィッティングした。試験した抗体についてのデータを以下の表9に示す。

30

【0232】

【表14】

表9:Biacore逆アッセイにより結合動力学

抗体	ヒト PAI-1		カニクイザル PAI-1	
	解離速度 kd (1/s)	親和性 KD (M)	解離速度 kd (1/s)	親和性 KD (M)
A39	7.09E-05	1.16E-11	ND	ND
A44	1.49E-05	3.76E-12	<= 1.0E-6	<=1.0E-13
A75	4.76E-04	1.20E-10	ND	ND
A105	1.64E-04	4.23E-11	ND	ND
B28	4.61E-04	6.5E-10	ND	ND
ND = 未決定				

40

【0233】

代表的な抗体の結合動力学を、Biacore順 (forward) アッセイにおいてビトロネクチン

50

及びPAI-1の複合体を用いてさらに分析しそして比較した。順アッセイにおいて、ヒトビトロネクチンタンパク質をフローセル Fc1-Fc4においてアミンカップリングによりCM5チップ上に固定した。次いで、ヒトPAI-1を、リガンドとしてフローセルFc2-Fc4においてヒトロネクチン表面に捕捉した。Fc1は参照セルとして保存された。抗体を40nMから開始して2倍希釈し、Fc1-4に注入した。動力学的データ分析を、Biacore BIAevaluationソフトウェアを使用して行った。センサーグラムは、最初に参照セル値及びプランク緩衝液値を差し引くことにより二重参照され、次いで1:1(Langmuir)モデルによりフィッティングし、全体R_{max}とともに使用した。

【0234】

【表15】

10

表10: Biacore順アッセイにおいてヒトビトロネクチン捕捉ヒトPAI-1へのA44結合の動力学

Vn 捕捉 hPAI-1 への A44 結合	kd (1/秒)	KD (M)
	<= 1.0E-6	<=1.0E-12

【0235】

表10におけるデータは、A44 が遊離ヒトPAI-1の他にビトロネクチン複合体のPAI-1にも結合するということを示した。

20

【0236】

実施例9: 初代ヒトサイボにおける機能性アッセイ

初代ヒト細胞による下流プラスミン産生を回復する各抗体の能力をさらに調べるために、プラスミン生成アッセイを使用した。発色アッセイにおいて高い有効性及びBiacoreにおいて良好な親和性を示した抗体のみをこのアッセイにおいて使用し試験した。

30

【0237】

1日目に、ヒト初代肝星細胞(ScienCell CA、カタログ番号SC5300)を、飢餓培地(DMEM Gibco+glutamax-1 4.5g/L D-グルコース、ピルビン酸(31966-021)、0.2%ウシ胎仔血清gold PAA(A11-152))中20000細胞/ウェルで37 ℃にて5% CO₂下でプレーティングした。2日目に、PAI-1活性を中和するために、抗体を組み換えPAI-1(Molecular Innovation、カタログ番号IGLYHPAI-A、組み換えグリコシル化ヒトPAI-1、最終濃度 5nM)とともに15分間室温でプレインキュベートした。同時に、tPA (Molecular Innovations (カタログ番号HTPA-T C)、レッドフェノール (red phenol) を含まないDMEM中5nM)を細胞とともに15分間37 ℃でインキュベートした。未結合のtPAを洗浄した後、PAI-1/mAb混合物を細胞に加え、次いで残留tPA活性を、添加及びGlu-プラスミノーゲン/基質混合物(Glu-Pg:Sigmaカタログ番号9001-91-6; 0.5 μM最終濃度)及びプラスミン発色基質:(CBS00.65 Stago カタログ番号00 128、0.5mM最終濃度)により測定した。

【0238】

プラスミンに対するプラスミノーゲン活性化を、37 ℃にて温度調節した分光光度計(IEMS、Thermofisher)を使用した45秒毎のA405/492の動力学的読み取りにより検出した。Biosiseソフトウェア(Thermofischer)は、発色基質切断の最大速度を計算した:プラスミン生成はV_{max}で表される: 1分あたりのA405/492nmの最大速度(mD0/分)を計算した。次いでPAI-1阻害を、参照(100%阻害)としてtPA単独及びPAI-1(mAb無し、阻害無しとして)を用いて計算し、そしてBiostat speedソフトウェアを使用してプロットしてIC₅₀及びImaxを計算した。

40

【0239】

【表 1 6 】

表 11: ヒト初代肝星細胞におけるプラスミノーゲン生成

抗体	IC50abs 平均 \pm sem (nM)	I _{max} 平均(%)	n
A44	3.32 \pm 0.34	97	7
A39	5.4 \pm 0.8	99	3
A71	8.61 \pm 3.6	90	3
A75	22.6 \pm 8.2	66	4
A105	27 \pm 7.8	88	3
B28	7.28 \pm 2.7	90	3
B109	6.11 \pm 0.88	94	3
C26	不活性	n/a	2
C45	6.5 \pm 1.11	97	4
E16	4.74 \pm 2.27	95	3
E21	不活性	n/a	3
33H1	22.92 \pm 12	56	3
33B8	不活性	n/a	3
n/a = 非適用			

【0240】

実施例 1 0 : Biacore競合アッセイによる抗体結合エピトープ調査

優れた結合活性及びブロッキング活性を有する抗PAI-1抗体の選択された群を、Biacore競合アッセイにおけるそれらの潜在的な結合エピトープについて調べた。アッセイにおいて、新しく同定された抗体のほかに、ヒトPAI-1上の既知の結合部位を有するいくつかの市販の抗PAI-1抗体を、ヒトPAI-1タンパク質に対する結合について競合するように設定した。各抗体を、CM5チップのフローセル上に標準的アミンカップリング反応を使用して固定した。クローンB28を除く全ての試験した抗体は、アミンカップリング後に結合部位活性を保持していた。ヒトPAI-1タンパク質を、チップ上に固定された抗体に捕捉し、続いて各抗体を検体として注入した。固定された抗体とヒトPAI-1上の異なる結合部位を有する検体抗体のみが、Biacoreにおいてさらなる結合シグナルを示す。競合実験を各固定抗体について2回繰り返し、そして結果を以下の表に示す。

【0241】

10

20

30

【表17】

表12: Biacore 競合アッセイからの結合エピトープの要旨

固定された抗体	検体抗体												
	33H1	33B8	A44	31C9	A71	A75	B109	B28	C45	C26	E16	E21	
33H1	c/c	b/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/c		
33B8	b/b	c/c	b/b	b/c	b/b	b/b	b/b	p/b	b/b	b/b	b/b	b/b	
A44	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	c/c	b/b	
31C9	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
A71	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	
A75	b/b	p/p	b/b	p/p	c/c	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	
B109	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	c/c	b/b	b/b	b/c	b/b	
B28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C45	b/b	p/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	
C26	b/c	p/c	b/b	b/b	b/b	b/b	b/b	b/c	b/b	c/c	b/b	c/c	
E16	b/b	p/b	b/c	b/b	b/b	p/b	b/b	b/c	b/b	b/b	c/c	b/b	
E21	b/c	b/c	b/b	b/c	b/c	b/b	b/b	b/c	b/b	b/c	b/b	c/c	
p=検体抗体による部分的結合、c=検体抗体による競合、b=検体抗体による結合； ”-“= 固定された抗体へのPAI-1 結合無し；nt = 未試験													

【0242】

A44が固定され、PAI-1に結合する場合、C45(検体抗体)は、A44が結合しているPAI-1に結合することができない。従って、C45は、A44がPAI-1上で結合する同じ結合部位について競合し(表12において「c/c」と示される)、又はPAI-1に結合しているA44は、PAI-1へのC45の結合を妨げる。この分析は、実験が逆順に繰り返された場合に裏付けられる。具体的には、C45が固定された抗体であり、そしてPAI-1に結合する場合、検体抗体としてのA44は、C45に結合したPAI-1に結合することができない(表12において「c/c」と示される)。同様の分析において、A71及びA75はPAI-1上の同じ部位について競合する。Biacore分析により、A44及びC45、さらにはA71及びA75が、PAI-1に結合する場合に互いに競合するか又は互いに妨害するということが裏付けられた。

【0243】

反対に、市販の抗体、33H1及び33B8は、A44と競合しない。A44が固定された抗体であり、かつPAI-1に結合される場合、33H1及び33B8の両方が、A44に結合しているPAI-1になお結合することができる(表12において「b/b」と示される)。これは逆実験において確認される。PAI-1が固定された33H1又は固定された33B8に結合される場合、A44はなおPAI-1に結合することができる。従って、市販の抗体33H1及び33B8は、PAI-1へのA44の結合と競合せず、妨害もしない。

10

20

30

40

50

【0244】

興味深いことに、いくつかの固定化された抗体(すなわち、B109)は、検体抗体(すなわち、33B8)の捕捉されたPAI-1タンパク質への結合をブロックしたが;固定された抗体の位置を検体抗体と交換した場合(例えば、チップ上の対を反転させる)、抗体対はもはやPAI-1への結合について互いに競合しない。例えば、B109がPAI-1に結合した固定化された抗体である場合、33B8はPAI-1に結合することができなかった。しかし、33B8がPAI-1に結合している固定された抗体である場合、B109はPAI-1に結合することができなかった。この結果に関する1つの可能な説明は、固定された抗体がPAI-1に結合される場合、PAI-1は第二の又は検体抗体にとって都合の悪いコンホメーションへと変わり得、そして検体抗体の結合を妨げるということである(例えば、B109が固定された抗体であり、かつ33B8が検体抗体である場合)。しかし、抗体対が逆の場合、固定抗体はPAI-1のコンホメーションが比較的变化しないような様式で結合し得、従って、検体抗体が結合したPAI-1に結合することが可能となる(すなわち、検体抗体B109は、固定された抗体33B8により結合したPAI-1に結合することができる)。従って、33B8とB109との間で観察された競合は、PAI-1上で重複した結合部位に起因するのではなく、B109に結合した場合のPAI-1におけるコンホメーション変化に起因するようであった。

【0245】

別の興味深い観察は、アミンカップリングを介して固定された場合にB28がヒトPAI-1への結合を喪失したということであり、これはB28のCDR領域が第一級アミノ基を有するアミノ酸を含むということを示唆した。

【0246】

実施例11：ヒト化のためのマウスモノクローナル抗体の選択

表13は、実行した5つの融合から最も活性なモノクローナル抗体を特徴づけるインピトロデータの要約を示す。これらのデータに基いて、A44はBiacoreにおいて最も高い親和性を有しながら、発色アッセイ及びプラスミン生成において最も有効であったので、A44をヒト化のために選択した。

【0247】

【表18】

表13：ヒトグリコシル化PAI-1に対するモノクローナル抗体親和性及び効力の要約

抗体	発色アッセイ (nM)	プラスミン生成 (nM)	親和性 Kd (M)	作用機構
A39 (IgG1/k)	1.70、1.00	5.4	1.16E-11	SH又は潜在
A44 (IgG1/k)	1.66、1.50、1.70	3.32	4.20E-14	基質
A71 (IgG1/k)	約4.00	8.61	ND	SH又は潜在
A75 (IgG2a/k)	3.00	22.6	1.20E-10	SH又は潜在
A105 (IgG1/k)	7.00	27.0	4.20E-11	SH又は潜在
B28 (IgG2b/k)	1.80	7.28	6.5E-10	SH又は潜在
B109 (IgG1/k)	0.23	6.11	ND	SH又は潜在
C26 (IgG1/k)	5.00	不活性	ND	基質
C45 (IgG2b)	0.5	10.6	ND	基質
E16 (IgG1)	1.1	4.74	ND	SH又は潜在
E21 (IgG2b)	1.3	216.0	ND	基質
SH =立体障害； ND = 未決定				

【0248】

表1に示される重鎖及び軽鎖配列は図12において整列され、そしてIMGTにより定義されるCDRは、太字で強調される。表13に示されるインピトロデータに基づいて、A44をヒ

10

20

40

50

30

ト化のために選択した。

【0249】

実施例12：抗PAI-1 A44 Fabの操作：不要な配列モチーフのヒト化、安定化及び変異PAI-1に対するA44マウス抗体の配列モチーフをヒト化し、安定化し、そして最適化するために以下で考察されるいくつかのアプローチが取られた。

【0250】

1) ヒト化

使用したヒト化プロトコルは、PCT/US08/74381(US20110027266)（その全体として参照により本明細書に加入される）に記載されている。マウスA44の可変軽(VL)及び可変重(VH)配列を、Molecular Operating Environment(MOE; v. 2010.10; Chemical Computing Group)で抗PAI-1 A44 軽鎖(LC)及び重鎖(HC)の相同性モデルを構築するために使用した。以下のテンプレートを使用した：軽鎖フレームワーク - 1D5I(フレームワーク領域において94%同一性)、重鎖フレームワーク - 3KS0(フレームワーク領域において96%同一性)、L1 - 1D5I (94%同一性)、L2 - 1D5I (94%同一性)、L3 - 1AXS (72%同一性)、H1 - 1IC7 (82%同一性)、H2 - 1MBU (68%同一性)及びH3 - 2WDB (62%同一性)。Trpが最初の残基であるため、H3ループは特にモデル作成が困難であった。2WDBもまた、より短いループであるが、ループの開始にTrp及びH3ループの末端に同じPhe-Asp-Tyr配列を有する。Glu-105(LC)及びHis-99の側鎖を再構築し、そしてその後のモデルを、MOEに実装されている標準的手順を使用してエネルギー最小化した。Generalized Born暗溶媒中1.1ナノ秒(n s)間500Kの温度でのタンパク質骨格に対する制限を用いて、マウスA44の最小3D相同性モデルの分子動力学(MD)シミュレーションを続けて行った。10の多様なコンホメーションをこの最初のMD実行から100ピコ秒(p s)ごとに最後の1ns間抽出した。次いでこれらの多様なコンホメーションを、タンパク質骨格に対する制限なく、300Kの温度で2.3ns間MDシミュレーションにかけた。次いで、10のMD実行のそれについて、MD軌道(trajectory)からの最後の2,000スナップショット(1psごとに1つ)を使用して、各マウスA44アミノ酸について、参照medoid位置と比較したその平均二乗偏差(root mean square deviations)(rmsd)を計算した。所定のアミノ酸の10の別々のMD実行での平均rmsdを全てのA44マウスアミノ酸の全体平均rmsdと比較することにより、アミノ酸が、MDの間に見られるように、T細胞受容体と相互作用し、免疫応答の活性の原因であるように考えられるほど十分に可動性であるかどうかを決定する。37アミノ酸を、CDR及びその周辺5オングストロームの近辺を除いて、マウスA44抗体において可動性と同定した。

【0251】

次いで、62の最も可動性のマウスA44アミノ酸の20ns(10×2ns)の間の動きを、49のヒト生殖系列相同性モデルの対応する可動性アミノ酸の動きと比較し、これらはそれぞれ10×2ns MDシミュレーションで実行された。49のヒト生殖系列モデルを、7つの最も一般的なヒト生殖系列軽鎖(vk1、vk2、vk3、vk4、vlambda1、vlambda2、vlambda3)及び7つの最も一般的なヒト生殖系列重さ(vh1a、vh1b、vh2、vh3、vh4、vh5、vh6)を系統的に組み合わせることにより構築した。vk1-vh2ヒト生殖系列抗体は、マウスA44抗体の可動性アミノ酸と比較して、その可動性アミノ酸の0.58 4D類似性を示した；従って、vk1-vh2生殖系列抗体を、可動性アミノ酸に焦点を合わせてA44抗体をヒト化するために使用した。vlambda3-vh4ヒト生殖系列は、第二の最も高い4D類似性、0.57を示し、そしてまたA44抗体のヒト化のための基礎として使用された。マウスA44とvk1-vh2アミノ酸との対になったアミノ酸会合のために、2つの配列を、2つの対応する相同性モデルのアルファ炭素の最適3D重ねあわせに基づいて整列させた。マウスA44とvlambda3-vh4との間の対になったアミノ酸会合を、同様の方法で行った。図13は、マウスA44 軽鎖のvk1及びvlambda3との整列を示す。図14は、マウスA44重鎖のvh2及びvh4との整列を示す。

【0252】

2) 安定化

a) 知識ベースのアプローチ

それらのそれぞれの標準(canonical)配列に対して低い発生頻度を有する軽鎖及び重

10

20

30

40

50

鎖のアミノ酸(CDRを除く)は、最も頻繁に見いだされるアミノ酸($\Delta G_{th} > 0.5 \text{ kcal/mol}$ に変異されることを提案された;(E. Monsellier, H. Bedouelle. J. Mol. Biol. 362, 2006, p. 580-593))。このLC及びHCについてのコンセンサス変異の最初のリストは、最も近いヒト生殖系列(vk1-vh2)中に見いだされるアミノ酸に限られていた。CDRの周辺付近(5オングストローム「Vernier」帯(J. Mol. Biol. 224, 1992, p. 487-499))における提案された変化は、考慮から外された。これにより、LCにおける2つの安定化変異(表15を参照のこと)及びHCにおける5つの安定化変異(表16を参照のこと)が生じる。他の基準は、抗P AI-1 A44抗体の潜在的安定化についてこれらの変異を検討するために考慮された。これらの基準は、表面でのヒドロパシーの都合の良い変化又は変異体の分子動力学ベースの推定される安定化であった。また、さらなる安定化変異は、文献(E. Monsellier & H. Bedouelle. J. Mol. Biol., 362, 2006, p. 580-593; B.J. Steipe et al. J. Mol. Biol. 1994, 240, 188-192)において成功したと報告しており、考慮したが(表17及び18を参照のこと)、さらなる変異は示唆されなかった。

【0253】

【表19】

表15:軽鎖において提案される安定化変異

残基	提案される変化	計算された $\Delta\Delta G_{th}$	変化受け入れ
Lys-3	Val	2.23998	否 - 生殖系列ではない
Met-11	Leu	0.766432	ヒト化において既に変化されている
Tyr-12	Ser	2.04389	ヒト化において既に変化されている
Leu-36	Val	2.17091	否 - Vernier
Lys-42	Gln	0.939652	否 - 生殖系列ではない
Thr-46	Leu	2.01966	否-Vernier
Gln-69	Thr	2.16357	否-Vernier
Tyr-80	Ala	2.92454	ヒト化において既に変化されている
Met-83	Leu	2.57007	ヒト化において既に変化されている
Gly-84	Ala	0.597822	有り
Ile-85	Thr	1.27255	有り

【0254】

【表 20】

表 16: 重鎖において提案される安定化変化

残基	提案される変化	計算された $\Delta\Delta G_{\text{th}}$	変化受け入れ
Glu-1	Gln	0.562423	有り
Met-2	Val	3.41361	否 - Vernier
Glu-6	Gln	0.655069	否 - 生殖系列ではない
Pro-9	Ala	0.505324	否 - 生殖系列ではない
Ser-10	Glu	2.40018	ヒト化において既に変化されている
Gln-16	Ala	1.11244	否 - 生殖系列ではない
Thr-17	Ser	1.79135	否 - 生殖系列ではない
Leu-18	Val	0.760243	否 - 生殖系列ではない
Ser-19	Lys	1.20539	否 - 生殖系列ではない
Thr-21	Ser	1.3289	否 - 生殖系列ではない
Ser-23	Lys	1.82798	否 - 生殖系列ではない
Val-24	Ala	1.35286	否 - 生殖系列ではない
Thr-25	Ser	1.72008	有り
Ile-37	Val	1.66985	否 - 生殖系列ではない
Arg-38	Lys	0.568427	否 - 生殖系列ではない
Lys-39	Gln	2.27769	有り
Phe-40	Arg	1.81199	否 - 生殖系列ではない
Asn-43	Lys	1.42568	ヒト化において既に変化されている
Lys-44	Gly	2.01606	ヒト化において既に変化されている
Tyr-47	Trp	2.62805	否 - Vernier
Met-48	Ile	1.67766	否 - Vernier
Pro-61	Glu	1.08569	否 - 生殖系列ではない
Ser-62	Lys	0.840485	否 - 生殖系列ではない
Leu-63	Phe	1.25428	否 - 生殖系列ではない
Arg-66	Lys	0.528008	否 - 生殖系列ではない
Ile-67	Ala	1.93707	否 - Vernier
Ser-68	Thr	1.36475	有り
Ile-69	Leu	0.550185	否 - Vernier
Arg-71	Val	0.61536	否 - Vernier
Asn-72	Asp	3.40632	有り
Thr-73	Lys	0.5597	否 - Vernier
Lys-75	Ser	0.81321	否 - 生殖系列ではない
Asn-76	Ser	0.744463	否 - 生殖系列ではない
Gln-77	Thr	1.30652	否 - 生殖系列ではない
Tyr-78	Ala	2.54699	否 - Vernier
Val-85	Leu	1.71111	否 - 生殖系列ではない
Thr-87	Ser	1.30394	否 - 生殖系列ではない
Thr-90	Ser	0.557686	否 - 生殖系列ではない
Thr-92	Val	1.13795	否 - 生殖系列ではない

【表 2 1】

表 17: 評価された安定化変異の組み合わせ

組み合わせ*	示唆されるさらなる変化	変化受け入れ
L1 (40->P & 42->Q)	無し – いずれも変化しない	変化なし
L2 (45->K)	無し – 既に K45	無し
L3 (74->T)	無し – 既に T74	無し
L4 (76->S)	無し – 既に S76	無し
L5 (84->A、 85->T)	無し – 安定化において 既に変化	無し
H1 (15->G)	無し – 生殖系列ではない	無し
H2 (61->E、 62->Lys、 63->Phe)	生殖系列にない	無し
H3 (86->T、 87->S、 88->E)	87 及び 88 生殖系列ではない	無し
S1 (L1 & L5)	無し	否
S2 (H1 & H3)	無し	否
*注: 残基を参照するため連続番号付けを使用した		

【0 2 5 6】

【表 2 2】

表 18*: 評価された安定化変異

軽鎖残基*	示唆されるさらなる変化	変化受け入れ
15->L	V15->L	否 – V _{k1} 生殖系列における V15
90->Q	無し – 既に Q90	無し
32->Y	無し – 既に Y32	無し
106->I	無し – 既に I106	無し
63->S	無し – 既に S63	無し
21->I	無し – 既に M21	無し
*注: 残基を参照するため連続番号付けを使用した		

【0 2 5 7】

10

20

30

40

50

b) 3D及びMDベースのアプローチ

3D及びMDベースのアプローチは以前に報告されている (Seco J.、Luque F.J.、Barri X.、J. Med. Chem. 2009 Apr 23:52(8):2363-71; Malin Jonsson et al.、J. Phys. Chem. B 2003、107:5511-5518)。抗体の疎水性領域は、二成分溶媒(水中20%イソプロパノール、20ns产生 (production) シミュレーション)におけるFabの分子動力学シミュレーションを分析することにより明確に同定された。Schrodingerのmaestroソフトウェア(v. 8.5.20 7)内の疎水性表面マップを使用したさらなる分析を完了した。これら2つの方法により分析されたタンパク質表面は非常に親水性であった。これら両方の技術を用いても、表面上のいざれかの疎水性パッチに寄与する残基は存在せず、従って抗凝集変異は示唆されなかった。

10

【0258】

3) グラフティングによるヒト化

グラフティング技術を使用するヒト化は以前に報告されている (P. T. Jones、P.H. Dear、J. Foote、M.S. Neuberger、G. Winter、Nature 1986、321:522-525)。ヒト化は、抗PAI1 A44可変ドメイン軽鎖及び重鎖に最も近い2つのヒト生殖系列を同定することにより開始した。これは、系統的に列挙された全てのヒト生殖系列に対してBLAST検索を行うことにより行った(カッパ及びラムダ鎖についてのV及びJドメイン;重鎖についてのV、D及びJドメインの全ての可能な組み合わせ)。BLAST検索を、国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI)により提供されるSequence Information Retrieval and Analysis (SIRA) サービスに連結されたインターネットアプリケーションを使用して行った。

20

【0259】

最も近いヒト生殖系列は、それぞれ抗PAI1 A44可変ドメイン軽鎖及び重鎖に対して70%及び67%の配列同一性で同定された。内部VBASE生殖系列を使用して、軽鎖はV_I-018(約64%同一性)遺伝子座に近いことが見出され、そして重鎖はVH4サブファミリーの4-30(約69%同一性)に近いことが見出された。CDR領域(Kabatに基づく)及びVernier残基は、mA44 軽鎖(A44LC)及びIGVK1-33-01_IGKJ4-01(IGVK1)について斜字で示される。J. Mol. Biol.、1992、224、487において定義されるVernier残基は、下線を引かれる。ヒト化変異(ボールド体)は、上で定義されるCDR及びVernier帶残基(マウスにおいても下線を引かれる)を除いて、2つの整列された配列の対比較を行うことにより得られた。マウス軽鎖からのT46L及びQ69T並びにマウス重鎖におけるM2V(Vernier帶残基)を、グラフティングアプローチによりヒト化の一部として大部分保存されたヒト生殖系列配列に変異させた(LC5a、HC5a)。別の変異体において、これらの3つのVernier帶残基を、元のマウス配列において見られるように保持した(LC5b、HC5b)。

30

【0260】

mA44 - 軽鎖(配列番号141)

【化1】

DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

40

ANRSVDGVPS RFSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTEGG

GTKLEIK

【0261】

IGVK1-33-01_IGKJ4-01 (配列番号107)

【化2】

DIQMTQSPSS LSASVGDRV~~T~~ ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD
 ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPLTFGG
 GTKVEIK

【0262】

mA44 - 重鎖(配列番号140)

10

【化3】

EMQLQESGPS LVKPSQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF
 PGNKLEYMGY ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTTSKNQYYL
 QLSSVTTEDT ATYYCARWHY GSPYYFDYWG QGTTLT~~V~~SS

【0263】

IGHV4-59-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02(配列番号108)

20

【化4】

QVQLQESGPG LVKPSET~~LSL~~ TCTVSGGSVS SYYWSWIRQP
 PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTTSKNQFSL
 KLSSVTAADT AVYYCARGYS SSWYYFDYWG QGTLVTVSS

【0264】

30

それぞれ抗PA11 A44可変ドメイン軽鎖及び重鎖に対して59%及び58%配列同一性を有する次に最も近いヒト生殖系列を同定した。内部VBASE生殖系列を使用して、この軽鎖は、V
III-L6 (約56%同一性)遺伝子座に近いことが見出され、そして重鎖はVH6サブファミリーの6-01遺伝子座に近いことが見出された。CDR領域(Kabatに基づく)及びVernier領域は斜字で示される。Vernier領域(J. Mol. Biol.、1992、224、487において定義されるとおり)及び下線を引かれる (and underlined)。ヒト化変異は、上で定義されボールド体で示されるCDR及びVernier帶の残基(マウスにおいても下線を引かれる)を除いて、2つの整列された配列の対比較を行うことにより得られた。

【0265】

mA44 - 軽鎖(配列番号141)

40

【化5】

DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG
 GTKLEIK

【0266】

IGKV3-11-02_IGKJ4-01(配列番号143)

50

【化6】

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD

ASN RATGIPA RFSGSGSGRD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGG

GTKVEIK

【0267】

mA44 - 重鎖(配列番号140)

10

【化7】

EMQLQESGPS LVKPSQTLS TCSVTGDSMT N..GYWNWIR

KFPGNKLEYM GYIT..YSGS TYYNPSLKGR ISITRNTSKN

Q_YYLQLSSVT TEDTATYYCA RWHYGSPYYF DYWGQGTTLT VSS

【0268】

IGHV6-1-02_IGHD6-13-01_IGHJ4-02 (配列番号 144)

20

【化8】

QVQLQQSGPG LVKPSQTLS TCAISGDSVS SNSAAWNWIR

QSPSRGLEWL GRTYYRSKWY NDYAVSVKSR ITINPDTTSKN

QFSQLQLNSVT PEDTAVYYCA RGYSSSWYYF DYWGQGTLVT VSS

【0269】

4) 不要な配列モチーフの変異

30

以下の配列モチーフを検討した:Asp-Pro(酸に不安定な結合)、Asn-X-Ser/Thr(グリコシル化、X=Pro以外のいずれかのアミノ酸)、Asp-Gly/Ser/Thr(スクシンイミド/可動性領域におけるiso-asp形成)、Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys(露出した脱アミド部位)、及びMet(露出した領域における酸化)。マウス抗PAI1 A44のVL及びVHドメインは、2つの潜在的なグリコシル化部位を有する:LC中のN⁵²RS(CDR2において)及びHC中のN⁷²TS。1つの露出した脱アミド部位がHCのCDR1中に存在する(N³¹G)。3つの潜在的なスクシンイミド形成部位が、元のマウス配列において同定されている:LC中のD⁵⁶G(CDR2の末端)、及びD²⁷S(CDR1において)及びHC中のD⁸⁹T。LCの問題のあるモチーフ、N⁵²RS及びD⁵⁶Gは、両方ともCDR2にある。これらの変異はCDRに発生するので、これらは以下の2つの提案された操作された配列における変異により対処された(LC2及びLC4)。N⁵²を保存的にGlnに変異させ、そしてD⁵⁶をGluに変異させた。4つの既存の問題のある残基がHCにあった。最初の2つはCDR1に発生する:潜在的スクシンイミド形成部位、D²⁷S、及び脱アミド部位N³¹G。2つのさらなる問題のあるモチーフもまた、第三のフレームワーク領域に存在する。CDR1において、スクシンイミドの形成を避けるためにD²⁷をEに変異させたが、N³¹はQに変更した。N⁷²及びD⁸⁹をそれぞれQ及びEに変更した。これらの問題のあるモチーフは、以下に記載される操作された配列HC2a及びHC4において対処された。HC2b変異体は、N³¹G脱アミド部位の変異のみを含む。

40

【0270】

得られたヒト化配列を、IEDBデータベース(immuneepitope.com)にワールドワイドウェブ上に見出される、バージョン2009年6月;Vita R.、Zarebeski L.、Greenbaum J.A.、

50

Emami H.、Hoof I.、Salimi N.、Damle R.、Sette A.、Peters B. The immune epitope database 2.0 Nucleic Acids Res. 2010, Jan, 38 (Database issue):D854-62. Epub 2009 Nov 11)に対して配列類似性について除去して (blasted)、配列がどれもいずれの公知のヒトB又はT細胞エピトープも含有していないということを確実にした(BLAST検索により得られた結果についてのカットオフとして 70 % の配列同一性を使用し、そしてヒト種からの結果のみを考慮した)。DeClerckら(国際公開第WO 2002034776号)は、PAI-1のエピトープに結合する抗体を開示し、それらはどれも本明細書に開示されるエピトープには問題がある。

【0271】

マウスA44 LCについては、Kirschmannら(The Journal of Immunology、1995、155、565 10 5-5662)からの1つのヒトエピトープがある。これは以下に示されるように14アミノ酸鎖にわたり約71%の同一性を有する。対照配列は、質量分析により確認されていない部分的配列であった。結合データはこのペプチドについて報告されていない。このエピトープは、提案された全てのLV変異体で見られた。潜在的に問題のあるエピトープは、同様の検索がHCについて行われた場合に同定されなかった。

【0272】

5) 抗PAI1可変ドメインの元の配列

CDRを太字で強調し、そしてVernier領域に(Foote及びWinter、J. Mol. Biol.、1992、2 24:487-499により定義されるとおり)下線を引いた。

【0273】

軽鎖(配列番号142)

【化9】

1 DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN **SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR**
 51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ **YDEFPPTE**GG
 101 GTKLEIKRAD AAPTVSIF

【0274】

胚性(Germinality)インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で70%

30

【0275】

重鎖(配列番号140)

【化10】

1 EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVTGDSMT **NGYWNWIRKF PGNKLEYMGY**
 51 **ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL** QLSSVTTEDT ATYYCARWHY
 101 **GSPYYFDYWG** QGTTLTVSS

40

【0276】

胚性インデックス=IGHV4-59-02_IGHD6-137-01_IGHJ4-02 [VH4 4-30]で67%

【0277】

6) 操作された配列

4Dヒト化及びグラフティングアプローチを、最も近い2つのヒト生殖系列配列に適用した

a) 操作された軽鎖配列

LC1aは、最も近い生殖系列配列vk1を使用して4Dヒト化法から誘導された7つの変異を含有する。LC1bは、2番目に近いヒト生殖系列配列v13に対する4Dヒト化から誘導された12の変異を有する。LC2は、LC1aと比較してCDR2において2つのさらなる変異を含有する

50

。これらの変異は、潜在的グリコシル化部位($N^{52}RS$)及び潜在的スクシンイミド形成部位($D^{56}G$)に対処する。LC3は、さらなる2つの安定化変異を含む、最も近い生殖系列配列に対する4Dヒト化からの変異を含有する。LC4は、ヒト化、安定化及び不要なモチーフ変異を組み合わせる。CDR及びvernier帯は斜字であり、vernier残基は下線を引かれ、ヒト化変異はポールド体であり、問題のあるモチーフは二重取り消し線であり、そして安定化変異は下の枠に示される。図16及び17は変異の要旨を示す。

【0278】

LC1a (配列番号91):

【化11】

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

10

51 ANRSVDGVPS RFSGSGSQD YSLTISSLQP EDLGIYYCLQ YDEFPPTEGG

101 GTKLEIK

【0279】

配列LC1aについてのさらなるヒトエピトープはIEDBデータベース中に見出されなかった。LC1a胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で76%。

【0280】

LC1b (配列番号92):

【化12】

1 DIKMTQSPSS VSVSPGQTVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GQSPKTLIYR

20

51 ANRSVDGVPS RFSGSGSQD YSLTISSLQA MDEGIYYCLQ YDEFPPTEGG

101 GTKLTIK

【0281】

上のセクション4に記載されたエピトープに加えて、K39PGQSPKTLIはKPGQPPRLLIに対して70%の配列同一性を有する(Kirschmann et al. J. Immun.、1995、155、5655-5662)。このペプチドは、それが試験された全てのHLA-DR対立遺伝子に対してIC50 >100,000nMを有すると報告されている。LC1b胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で67%。

30

【0282】

LC2 (配列番号93):

【化13】

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

51 AQRSVEGVPS RFSGSGSQD YSLTISSLQP EDLGIYYCLQ YDEFPPTEGG

40

101 GTKLEIK

【0283】

IEDBデータベースにおいて配列LC2についてのさらなるヒトエピトープは見られなかった。

LC2胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で76%。

【0284】

LC3 (配列番号94):

【化14】

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

51 ANRSVDGVPS RFSGSGQD YSLTISSLQP EDLatYYCLQ YDEFPPTFGG

101 GTKLEIK

【0285】

IEDBデータベースにおいて配列LC3についてのさらなるヒトエピトープは見出されなかつた。LC3胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で78%。

10

【0286】

LC4 (配列番号95):

【化15】

1 DIKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR

51 AQRSVEGVPS RFSGSGQD YSLTISSLQP EDLatYYCLQ YDEFPPTFGG

101 GTKLEIK

【0287】

20

IEDBデータベースにおいて配列LC4についてのさらなるヒトエピトープは見出されなかつた。LC4胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で78%。

【0288】

LC5a (配列番号96):

【化16】

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKLLIYR

51 ANRSVDGVPS RFSGSGTD YFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTFGG

101 GTKVEIK

30

【0289】

上のセクション4に記載されるエピトープに加えて、A43PKLLIYRANはAPKLLIYAASSLに対して80%の配列同一性を有する(Kirschmann et al. J. Immun.、1995、155、5655-5662)。分子量はこのペプチドでは測定されず、そして結合データは報告されなかった。LC5a胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で85%。

【0290】

LC5b (配列番号97):

【化17】

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKTLIYR

40

51 ANRSVDGVPS RFSGSGCD YFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTFGG

101 GTKVEIK

【0291】

IEDBデータベースにおいて配列LC5bについてのさらなるヒトエピトープは同定されなかつた。

LC5b胚性インデックス=IGKV1-33-01_IGKJ4-01 [V I-018]で83%。

【0292】

50

LC5c (配列番号98):

【化18】

1 EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQDIN SYLSWLQQKP GQAPRTLIYR

51 ANRSVDGIPA RFSGSGSGQ YLTIISSLEP EDFAVYYCLQ YDEFPPTFGG

101 GTKVEIK

【0293】

上のセクション4に記載されるエピトープに加えて、K³⁹PGQAPRTL1はKPGQPPRLL1に対して80%の配列同一性を有する(Kirschmann et al. J. Immun.、1995、155、5655-5662)。このペプチドは、それが試験された全てのHLA-DR対立遺伝子に対してIC50 >100,000 nM LC5cを有すると報告された。胚性インデックス=IGKV3-11-02_IGKJ4-01 [V III-L6]で79%。全ての軽鎖変異の図表は図15に示される。

【0294】

b) 操作された重鎖配列

HC1aは、最も近いヒト生殖系列配列に対する4Dヒト化法から誘導された8つの変異を含有する。HC1bは、2番目に近い生殖系列配列に対する4Dヒト化法から誘導された6つの変異を含有する。HC2aは、不要な配列モチーフに対処するために、HC1aと比較した場合に4つのさらなる変異を含有する。HC2bはCDR1における脱アミド部位(N³¹G)に対処するのみである。HC3は、さらなる5つの安定化変異を含むHC1aからのヒト化変異を含有する。HC4は、HC1aからのヒト化変異、HC3からの安定化変異及びHC2aからの問題のあるモチーフに対処する変異を含有する。CDR及びvernier帯は斜字で、vernier残基は下線を引かれ、ヒト化変異はボールド体であり、問題のあるモチーフは二重取り消し線であり、そして安定化変異は下の枠に示される。

【0295】

HC1a (配列番号82):

【化19】

1 EMTLKESGPT LVKPTQTLSL TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKALEYMGY

30

51 ITYSGSTYYN PSLKGRSIT RNTSKNQYYL TLSSVTTVDT ATYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

【0296】

IEDBデータベースにおいて配列HC1aについてヒトエピトープは同定されなかった。HC1a胚性インデックス=IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で68%。

【0297】

HC1b (配列番号83):

【化20】

40

1 EMQLQESGPG LVKPSETLSL TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKGLEYMGY

51 ITYSGSTYYN PSLKGRSIT RNTSKNQYYL KLSSVTTADT ATYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

【0298】

IEDBデータベースにおいて配列HC1bについてヒトエピトープは同定されなかった。HC1b胚性インデックス=IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で73%。

【0299】

50

HC2a (配列番号84):

【化21】

1 EMTLKE~~S~~GPT LVKPTQTL~~S~~LC TCSVTG~~E~~SMT QGYWNWIRKF PGKALEYMGY

51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RQTSKNQYYL TLSSVTTVET ATYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTTLT~~V~~~~S~~~~S~~

【0300】

IEDBデータベースにおいて配列HC2aについてヒトエピトープは同定されなかった。HC2a 10
胚性インデックス=IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で67%。

【0301】

HC2b (配列番号85):

【化22】

1 EMTLKE~~S~~GPT LVKPTQTL~~S~~LC TCSVTGDSMT QGYWNWIRKF PGKALEYMGY

51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNTSKNQYYL TLSSVTTVDT ATYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTTLT~~V~~~~S~~~~S~~

20

【0302】

IEDBデータベースにおいて配列HC2bについてヒトエピトープは同定されなかった。HC2b
胚性インデックス=IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で67%。

【0303】

HC3 (配列番号86):

【化23】

1 qMTLKE~~S~~GPT LVKPTQTL~~S~~LC TCSVsGDSMT NGYWNWIRqF PGKALEYMGY

51 ITYSGSTYYN PSLKGRITT RdTSKNQYYL TLSSVTTVDT ATYYCARWHY

30

101 GSPYYFDYWG QGTTLT~~V~~~~S~~~~S~~

【0304】

IEDBデータベースにおいて配列HC3についてヒトエピトープは同定されなかった。HC3胚
性インデックス=IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で72%。

【0305】

HC4 (配列番号87):

【化24】

1 qMTLKE~~S~~GPT LVKPTQTL~~S~~LC TCSVsGESMT QGYWNWIRqF PGKALEYMGY

40

51 ITYSGSTYYN PSLKGRITT RQTSKNQYYL TLSSVTTVET ATYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTTLT~~V~~~~S~~~~S~~

【0306】

IEDBデータベースにおいて配列HC4についてヒトエピトープは同定されなかった。HC4
胚性インデックス=IGHV4-31-03_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で70%。

【0307】

HC5a (配列番号88):

【化25】

1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGDSMT NGYWWIRQP PGKGLEYMGY

51 ITYSGSTYYN PSLKSRITIS RNTSKNQYSL KLSSVTAADT AVYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTLTVSS

【0308】

Iedbデータベースにおいて配列HC5aについてヒトエピトープは同定されなかった。HC5a
胚性インデックス=IGHV4-59-02IGHD6-13-01IGHJ4-02 [VH4 4-59]で84%。

10

【0309】

HC5b (配列番号89):

【化26】

1 QMQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGDSMT NGYWWIRQP PGKGLEYMGY

51 ITYSGSTYYN PSLKSRITIS RDTSKNQYSL KLSSVTAADT AVYYCARWHY

101 GSPYYFDYWG QGTLTVSS

20

【0310】

Iedbデータベースにおいて配列HC5bについてヒトエピトープは同定されなかった。HC5b
胚性インデックス=IGHV4-59-02IGHD6-13-01IGHJ4-02 [VH4 4-59]で84%。

【0311】

HC5c (配列番号90):

【化27】

1 QMQLQQSGPG LVKPSQTLSL TCAISGDSMT NGYWWIRQS PSRGLEYMGY

51 ITYSGSTYYA VSVKSRITIN RDTSKNQYSL QLSSVTPEDT AVYYCARWHY

30

101 GSPYYFDYWG QGTLTVSS

【0312】

Iedbデータベースにおいて配列HC5cについてヒトエピトープは同定されなかった。HC5c
胚性インデックス=IGHV6-1-02IGHD6-13-01IGHJ4-02 [VH6 6-01]で78%。

【0313】

全ての重鎖変異の図表を図16に示す。

【0314】

c) 重鎖及び軽鎖変異体配列の組み合わせ

グラフティングのために、軽鎖の3つのバージョン(LC5a、LC5b、LC5c)及び重鎖の3つのバージョン(HC5a、HC5b、HC5c)を作製した。LC5aは、最も近いヒト生殖系列配列に対するグラフティングから誘導される16の変異を含み、かつマウスCDR及びマウスVernier帶残基の大部分を保持する。2つのマウスVernier残基T46及びN69は、いずれのヒト生殖系列配列にも存在せず、保存的に変異された。LC5bは、最も近いヒト生殖系列配列に対するグラフティングから誘導された14の変異を含有し、そしてマウスCDR及び全てのマウスVernier帶残基を保持していた。LC5cは、二番目に近いヒト生殖系列配列へのグラフティングから誘導された22の変異を含有し、そしてマウスCDR及び全てのマウスVernier帶残基を保持していた。

40

【0315】

HC5aは、最も近いヒト生殖系列配列へのグラフティングから誘導された20の変異を含有

50

し、そしてマウスCDR及びM2Vを除くマウスVernier帯残基の大部分を保持していた。Metは、非常に低い傾向でヒト生殖系列配列のこの位置に出現する。HC5bは、最も近いヒト生殖系列配列へのグラフティングから誘導された20の変異を含有し、そしてマウスCDR及び全てのマウスVernier帯残基を保持する。HC5cは、2番目に近いヒト生殖系列配列へのグラフティングから誘導された23の変異を含有し、そしてマウスCDR及び全てのマウスVernier帯残基を保持する。

【0316】

合計で10の組み合わせを準備した(表19にまとめる):

- LC1a x HC1a (最も近い生殖系列配列に基づいて4Dヒト化に対処する変異)
- LC1b x HC1b (2番目に近い生殖系列配列に基づいて4Dヒト化に対処する変異) 10
- LC2 x HC2a (4Dヒト化及び不要な配列に対処する変異)
- LC2 x HC2b (4Dヒト化及び不要な配列に対処する変異)
- LC1a x HC2b (4Dヒト化及び不要な配列に対処する変異)
- LC3 x HC3 (4Dヒト化及び安定化に対処する変異)
- LC4 x HC4 (4Dヒト化、不要な配列及び安定化に対処する変異)
- LC5a x HC5a (グラフティングによるヒト化、CDRの保持、及び3つの保存的Vernier改变の組み込みに対処する変異)
- LC5b x HC5b (グラフティングによるヒト化CDR及びVernier領域の保持に対処する変異)
- LC5c x HC5c (グラフティングによるヒト化CDR及びVernier領域の保持に対処する変異) 20

【0317】

【表 2 3】

表 19: 10 の LC x HC 組み合わせのまとめ

	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H+UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H+UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
HC1a (H)	X(1)							
HC1b (H)		X(2)						
HC2a (H+UM)			X(3) Low					
HC2b (H+UM)	X(4)		X(5)					
HC3 (H+S)			X(11)	X(6)	X(12)			
HC4 (H+UM+S)					X(7) Low			
HC5a (G)						X(8)		
HC5b (G)			X(13)		X(14)		X(9)	
HC5c (G)								X(10) Low

H=ヒト化; UM= 不要なモチーフ; S=安定化; G=グラフティング
Low=低発現レベル
()内の数字は変異体番号を示す; 注: 変異体 11-14 は元の 10 の変異体 (変異体 1-10) の特徴付け後に加えられた

【 0 3 1 8 】

【表24】

表21: 抗PAI1 A44抗体の8つのLC変異体の変異

LC 段階的 番号付け	LC1a (H)	LC1b (H)	LC2 (H-UM)	LC3 (H+S)	LC4 (H-UM+S)	LC5a (G)	LC5b (G)	LC5c (G)
Asp1								Glu
Lys3						Gln	Gln	Val
Ser9								Ala
Ser10								Thr
Met11	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
Tyr12	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Ala13		Val						Leu
Leu15	Val	Pro	Val	Val	Val	Val	Val	Pro
Glu17	Asp	Gln	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	
Arg18		Thr						
Val19								Ala
Ile21								Leu
Thr22								Ser
Lys42		Gln						Gln
Ser43						Ala	Ala	Ala
Lys45								Arg
Thr46						Leu		
Asn52			Gln		Gln			
Asp56			Glu		Glu			
Val58								Ile
Ser60								Ala
Gln69						Thr		
Ser72						Thr	Thr	Thr

【0319】

【表 25】

Leu73						Phe	Phe	
Glu79	Gln							
Tyr80	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Glu81		Met						
Met83	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe
Gly84				Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Ile85				Thr	Thr	Thr	Thr	Val
Leu104						Val	Val	Val
Glu105		Thr						
変異の数	7	12	9	9	11	16	14	22

H=ヒト化; UM= 不要なモチーフ; S=安定化; G=グラフティング

10

20

【0320】

【表26】

表22:抗PAI1 A44抗体の9つのHC変異体の変異

HC段階的番号付け	HC1a (H)	HC1b (H)	HC2a (H-UM)	HC2b (H-UM)	HC3 (H+S)	HC4 (H-UM+S)	HC5a (G)	HC5b (G)	HC5c (G)
Glu1					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Met2							Val		
Gln3	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Glu5	Lys		Lys	Lys	Lys	Lys			Gln
Ser10	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly
Ser15	Thr		Thr	Thr	Thr	Thr			
Gln16		Glu					Glu	Glu	
Ser23							Thr	Thr	Ala
Val24									Ile
Thr25					Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
Asp27			Glu			Glu			
Asn31			Gln	Gln		Gln			
Lys39					Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Phe40							Pro	Pro	Ser
Gly42									Ser
Asn43	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg
Lys44	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
Asn60									Ala
Pro61									Val
Leu63									Val

【0321】

【表27】

Gly65							Ser	Ser	Ser
Ser68					Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
Thr70							Ser	Ser	Asn
Asn72			Gln		Asp	Gln		Asp	Asp
Tyr79							Ser	Ser	Ser
Gln81	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	
Thr87							Ala	Ala	Pro
Glu88	Val	Ala	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	
Asp89			Glu			Glu			
Thr92							Val	Val	Val
Thr114							Leu	Leu	Leu
Leu115							Val	Val	Val
変異の数	8	6	12	9	13	16	20	20	23
H=ヒト化; UM= 不要なモチーフ; S=安定化; G=グラフティング									

10

20

30

【0322】

要約すると、10の変異体がヒト化プロセスの間に生成された。これらの変異体は発現され、そして以下に記載されるいくつかのインビトロアッセイにおいて特徴付けされた。

【0323】

7) 変異体におけるヒト化の特徴付け

上の実施例において示されたコンピュータによるモデリングに基いて、10の変異体を生成した(4Dヒト化による変異体1~8及びCDRグラフティングによる変異体9~10; 変異体3及び10は、2番目に近い生殖系列に対して生成された)。ヒト化A44の軽鎖及び重鎖DNAの可変領域をHEK293発現のために準備した。タンパク質を、対応するDNAのpXLプラスミド(New England Biolabs; HCについてはNheI/Eco47111、LCについてはNheI/BsiWI)へのクローニングのあとに生成した。ヒト化配列は、HEK発現に最適化されたコドン及びGeneArt(Life Technologiesの子会社)により合成された遺伝子であった。得られたプラスミドを、同時にトランスフェクトし、そしてFreeStyleTM293発現系(Invitrogen、カタログ番号K9000-01)において一過性発現させた。変異体3及び10は不十分にしか発現せず、さらに続行しなかった。全ての他の変異体は発現され、プロテインAカラムを使用して精製された。分析用ゲルは、変異体6及び9における軽鎖並びに変異体5及び7における重鎖の部分的グリコシル化(約5~10%)を示した(データは示さず)。残りの8つの変異体を、hPAIを使用する発色アッセイ及びヒトグリコシル化PAIを使用するヒト星状細胞におけるプラスミン生成アッセイにおいて試験した。結果を表23に示す。

40

50

【0324】

【表28】

表23: プラスミン生成及び発色アッセイにおけるヒト化変異体の特徴付け

	プラスミノーゲン活性化		発色アッセイ
mAb	IC50 (nM)	Y50%	IC50 (nM)
A44	3.17	45.99	0.44
A44-hv1	3.12	44.99	0.49
A44-hv2	未決定	未決定	0.60
A44-hv4	不活性	26.00	0.52
A44-hv5	未決定	未決定	1.11
A44-hv6	1.78	56.94	0.82
A44-hv7	未決定	未決定	0.59
A44-hv8	不活性	11.00	0.76
A44-hv9	1.9	46.53	0.86

【0325】

変異体6及び9は、プラスミン生成アッセイにおいて最も良好な効力を示したが、軽鎖において部分的(5~10%)グリコシル化を有していた。これらの結果に基づいて、新しい変異体11~14を、変異体6及び9からの重鎖並びに変異体5及び7からの軽鎖の組み合わせを使用して製造した。表24は、作製した全ての変異体の要約を示す。

【0326】

10

20

30

【表 29】

表 24: ヒト化変異体

変異体番号	説明	配列番号
A44-hv1	LC1a x HC1a	109
A44-hv2	LC1b x HC1b	110
A44-hv3	LC2 x HC2a	111
A44-hv4	LC1a x HC2b	112
A44-hv5	LC2 x HC2b	113
A44-hv6	LC3 x HC3	114
A44-hv7	LC4 x HC4	115
A44-hv8	LC5a x HC5a	116
A44-hv9	LC5b x HC5b	117
A44-hv10	LC5c x HC5c	118
A44-hv11	LC2 x HC3	119
A44-hv12	LC4 x HC3	120
A44-hv13	LC2 x HC5b	121
A44-hv14	LC4 x HC5b	122

10

20

30

【0327】

40

【表 3 0】

表 25: DNA 配列ヒト化変異体

	遺伝子	タンパク質	
HC1a	GAGATGACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACC CTGGTCAAACCCACCCAGACCCCTGAGCCTGA CCTGCAGCGTGACCGGCGACAGCATGACCA ACGGCTACTGGAACTGGATCCCGAAGTTCCC CGGCAAGGCCCTCGAGTACATGGGCTACAT CACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACCCC AGCCTGAAGGGCCGGATCAGCATCACCCGG AACACCAGCAAGAACCAAGTACTACCTGACC CTGTCCAGCGTG (配列番号 123)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSLTC SVTGDSMTNGYWNWIRKFPG KALEYMGYITYSGSTYYNPSL KGRISITRNTSKNQYYLTLSV TTVDTATYYCARWHYGPYY FDYWGQGTTLTVSS (配列番号 82)	10
HC1b	GAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGC CTGGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGCAGCGTGACCGGCGACAGCATGACC AACGGCTACTGGAACTGGATCCCGAAGTTCC CCCGGCAAGGCCCTCGAGTACATGGGCTAC ATCACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACC CCAGCCTGAAGGGCCGGATCAGCATCACCC GGAACACCAGCAAGAACCAAGTACTACCTGA AGCTGTCCAGCGTG (配列番号 124)	EMQLQESGPGGLVKPSETLSLTC SVTGDSMTNGYWNWIRKFPG KGLEYMGYITYSGSTYYNPSL KGRISITRNTSKNQYYLKLSSV TTADTATYYCARWHYGPYY FDYWGQGTTLTVSS (配列番号 83)	20
HC2a	GAGATGACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACC CTGGTCAAACCCACCCAGACCCCTGAGCCTGA CCTGCAGCGTGACCGGCGAGAGCATGACCC AGGGCTACTGGAACTGGATCCCGAAGTTCC CCGGCAAGGCCCTCGAGTACATGGGCTACA TCACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACCC CAGCCTGAAGGGCCGGATCAGCATCACCCG GCAGACCAGCAAGAACCAAGTACTACCTGAC CCTGTCCAGCGTG (配列番号 125)	EMTLKESGPTLVKPTQTLSLTC SVTGESMTQGYWNWIRKFPG KALEYMGYITYSGSTYYNPSL KGRISITRNTSKNQYYLTLSV TTVETATYYCARWHYGPYY FDYWGQGTTLTVSS (配列番号 84)	30
HC2b	GAGATGACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACC CTGGTCAAACCCACCCAGACCCCTGAGCCTGA CCTGCAGCGTGACCGGCGACAGCATGACCC AGGGCTACTGGAACTGGATCCCGAAGTTCC CCGGCAAGGCCCTCGAGTACATGGGCTACA TCACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACCC CAGCCTGAAGGGCCGGATCAGCATCACCCG GAACACCAGCAAGAACCAAGTACTACCTGAC	EMTLKESGPTLVKPTQTLSLTC SVTGDSMTQGYWNWIRKFPG KALEYMGYITYSGSTYYNPSL KGRISITRNTSKNQYYLTLSV TTVDTATYYCARWHYGPYY FDYWGQGTTLTVSS (配列番号 85)	40

【0328】

【表 3 1】

	CCTGTCCAGCGTG (配列番号 126)	
HC3	CAGATGACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACC CTGGTCAAACCCACCCAGACCCCTGAGCCTGA CCTGCAGCGTGTCCGGCGACAGCATGACCA ACGGCTACTGGAACCTGGATCCGGCAGTTCCC CGGCAAGGCCCTCGAGTACATGGGCTACAT CACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACCCC AGCCTGAAGGGCCGGATCACCATCACCCGG GACACCAGCAAGAACCAAGTACTACCTGACC CTGAGCAGCGTG (配列番号 127)	QMLKESGPTLVKPTQTLSLT CSVSGDSMTNGYWNWIRQFP GKALEYMGYITYSGSTYYNPS LKGRIITRDTSKNQYYLTSS VTTVDTATYYCARWHYGSPY YFDYWGQGTTLTVSS (配列番号 86)
HC4	CAGATGACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACC CTGGTCAAACCCACCCAGACCCCTGAGCCTGA CCTGCAGCGTGTCCGGCGAGAGCATGACCC AGGGCTACTGGAACCTGGATCCGGCAGTTCCC CGGCAAGGCCCTCGAGTACATGGGCTACAT CACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACCCC AGCCTGAAGGGCCGGATCACCATCACCCGG CAGACCAGCAAGAACCAAGTACTACCTGACC CTGAGCAGCGTG (配列番号 128)	QMLKESGPTLVKPTQTLSLT CSVGESMTQGYWNWIRQFP GKALEYMGYITYSGSTYYNPS LKGRIITRQTSKNQYYLTSS VTTVETATYYCARWHYGSPY YFDYWGQGTTLTVSS (配列番号 87)
HC5a	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGC CTGGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGCACCGTGTCCGGCGACAGCATGACC AACGGCTACTGGAACCTGGATCCGGCAGCCC CCTGGCAAGGGCCTCGAGTACATGGGCTAC ATCACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACC CCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCAGCCG GAACACCAGCAAGAACCAAGTACAGCCTGAA GCTGAGCAGCGTG (配列番号 129)	QVQLQESGPLVKPSETLSLT TVSGDSMTNGYWNWIRQPPG KGLEYMGYITYSGSTYYNPSL KSRRITISRNTSKNQYSLKLSSVT AADTAVYYCARWHYGSPYYF DYWGQGTLTVSS (配列番号 88)
HC5b	CAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGC CTGGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGCACCGTGTCCGGCGACAGCATGACC AACGGCTACTGGAACCTGGATCCGGCAGCCC CCTGGCAAGGGCCTCGAGTACATGGGCTAC ATCACCTACAGCGGCAGCACCTACTACAACC CCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCAGCCG GGACACCAGCAAGAACCAAGTACAGCCTGAA GCTGAGCAGCGTG (配列番号 130)	QMQLQESGPLVKPSETLSLT CTVSGDSMTNGYWNWIRQPP GKGLEYMGYITYSGSTYYNPS LKSRRITISRNTSKNQYSLKLSSV TAADTAVYYCARWHYGSPYY FDYWGQGTLTVSS (配列番号 89)

【0329】

【表 3 2】

HC5c	<p>CAGATGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGC CTGGTCAAACCCAGCCAGACCCCTGAGCCTG ACCTGCGCCATCAGCGCGACAGCATGACC AACGGCTACTGGAACTGGATCCGGCAGAGC CCCAGCAGAGGCCCTCGAGTACATGGGCTAC ATCACCTACAGCGGCAGCACCTACTACGCCG TGTCCGTGAAGTCCCCGATCACCATCAACCG GGACACCAGCAAGAACCAAGTACAGCCTGCA GCTGAGCAGCGTG (配列番号 131)</p>	<p>QMQLQQSGPGLVKPSQLSLT CAISGDSMTNGYWNWIRQSPS RGLEYMGYITYSGSTYYAVSV KSRTITNRDTSKNQYSLQLSSV TPEDTAVYYCARWHYGSPYY FDYWGQGTLVTVSS (配列番号 90)</p>	10
LC1a	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACC ATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAAC AGCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGAGCCCCAAGACCCCTGATCTACCGG GCCAACCGCAGCGTGGACGGCGTGCCAAGC AGATTTCGGCAGCGGCAGCGGCCAGGAC TACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCC AGGACCTGGGCATC (配列番号 132)</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGKS PKTLIYRANRSVDGVPSRFSGS GSGQDYSLTISSSLQPEDLGIYY CLQYDEFPPTFGGGTKLEIK (配列番号 91)</p>	20
LC1b	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC GTGTCCGTGTCTCCTGCCAGACCGTGACCA TCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACA GCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GCCAGTCCCCAAGACCCCTGATCTACCGG CAACCGCAGCGTGGACGGCGTGCCAAGCAG ATTTCGGCAGCGGCAGCGGCCAGGACTA CAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCAT GGACGAGGGCATC (配列番号 133)</p>	<p>DIKMTQSPSSVSVSPGQTVTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGQS PKTLIYRANRSVDGVPSRFSGS GSGQDYSLTISSSLQAMDEGIYY CLQYDEFPPTFGGGTKLTIK (配列番号 92)</p>	30
LC2	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACC ATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAAC AGCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGAGCCCCAAGACCCCTGATCTACCGG GCCCAGCGGAGCGTGGAAAGGCGTGCCAAGC AGATTCAAGCGGCAGCGGCTCCGGCCAGGAC TACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCC AGGACCTGGGCATC (配列番号 134)</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGKS PKTLIYRAQRSVEGVPSRFSGS GSGQDYSLTISSSLQPEDLGIYY CLQYDEFPPTFGGGTKLEIK (配列番号 93)</p>	40
LC3	<p>GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACC</p>	<p>DIKMTQSPSSLSASVGDRVTTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGKS</p>	

【表 3 3】

	ATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAAC AGCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGAGCCCCAAGACCCCTGATCTACCGG GCCAACCGCAGCGTGGACGGCGTCCAAGC AGATTTCGGCAGCGGCAGCGGCCAGGAC TACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACCTGGCCACC (配列番号 135)	PKTLIYRANRSVDGVPSRSGS GSGQDYSLTISLQPEDLATYY CLQYDEFPPTFGGGTKLEIK (配列番号 94)	10
LC4	GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACC ATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAAC AGCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGAGCCCCAAGACCCCTGATCTACCGG GCCAGCGGAGCGTGGAGGGCGTCCAAGC AGATTCAAGCGGCAGCGGCAGCGGCCAGGAC TACAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGACCTGGCCACC (配列番号 136)	DIKMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGKS PKTLIYRAQRSVEGVPSRSGS GSGQDYSLTISLQPEDLATYY CLQYDEFPPTFGGGTKLEIK (配列番号 95)	20
LC5a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACC ATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAAC AGCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACCGG GCCAACCGCAGCGTGGACGGCGTCCAAGC AGATTTCGGCAGCGGCAGCGGCCAGCGACT ACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGA GGATATCGCCACC (配列番号 137)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGKA PKLLIYRANRSVDGVPSRSGS GSGTDYTFTISLQPEDIATYY CLQYDEFPPTFGGGTKVEIK (配列番号 96)	30
LC5b	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACC ATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAAC AGCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCAAGACCCCTGATCTACCGG GCCAACCGCAGCGTGGACGGCGTCCAAGC AGATTTCGGCAGCGGCAGCGGCCAGGAC TACACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACC (配列番号 138)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQDINSYLSWLQQKPGKA PKTLIYRANRSVDGVPSRSGS GSGQDYTFTISLQPEDIATYY CLQYDEFPPTFGGGTKVEIK (配列番号 97)	40
LC5c	GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCACC CTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGGCCACCC TGAGCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACA GCTACCTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCG	EIVMTQSPATLSLSPGERATLS CKASQDINSYLSWLQQKPGQA PRTLIYRANRSVDGIPARFSGS GSGQDYTTLTISSLEPEDFAVYY	

【0 3 3 1】

【表34】

	GCCAGGCCAGAACCTGATCTACCGGG CCAACAGAACGTGGACGGCATCCCCGCCA GATTCAAGCGGCAGCGGCTCCGGCCAGGACT ACACCCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCG AGGACTTCGCCGTG (配列番号139)	CLQYDEFPPTFGGGTKVEIK (配列番号98)
		タンパク質
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREGQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF (配列番号99)	10
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDKSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号100)	

20

【0332】

不十分に発現された変異体3及び10を除く全ての変異体を、ヒト及びカニクイザルPAI-1並びにピトロネクチン-PAI-1複合体に対してBiacoreにおいて試験した。データを表26に示す。

【0333】

【表 3 5】

表 26: Biacore におけるヒト化変異体の特徴付け

ヒトロネクチンチップ / ヒト PAI-1			
mAb/hPAI-1/Vn	ka1 (1/Ms)	kd 1 (1/s)	KD (M)
A44 親 *	5.68E+06	2.29E-04	4.04E-11
A44-hv1*	1.10E+07	5.55E-04	5.26E-11
A44-hv2**	2.99E+06	4.03E-04	1.35E-10
A44-hv4*	4.59E+06	8.80E-05	1.92E-11
A44-hv5*	2.72E+06	2.76E-05	1.02E-11
A44-hv6*	4.38E+06	5.68E-05	1.33E-11
A44-hv7**	4.14E+06	3.94E-04	9.64E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6.36E+06	1.03E-04	1.70E-11
A44-hv11*	7.66E+06	1.22E-04	1.56E-11
A44-hv12*	5.15E+06	8.14E-05	1.61E-11
A44-hv13**	2.40E+06	4.36E-04	1.79E-10
A44-hv14*	4.06E+06	3.95E-05	9.57E-12
ヒトロネクチンチップ / カニクイザル PAI-1			
mAb/cPAI-1/Vn	ka1 (1/Ms)	kd 1 (1/s)	KD (M)
A44 親 *	3.98E+06	2.75E-04	6.96E-11
A44-hv1**	3.37E+06	8.27E-03	2.45E-09
A44-hv2**	2.30E+06	3.14E-04	1.37E-10
A44-hv4**	2.26E+05	1.70E-04	7.52E-10
A44-hv5*	3.40E+06	1.11E-04	3.26E-11
A44-hv6*	5.26E+06	2.51E-05	5.01E-12
A44-hv7**	2.50E+06	2.39E-04	9.56E-11
A44-hv8*	n/a	n/a	n/a
A44-hv9*	6.51E+06	1.34E-04	2.15E-11
A44-hv11**	1.56E+06	6.00E-04	3.87E-10
A44-hv12*	4.26E+06	2.35E-04	5.69E-11
A44-hv13**	2.12E+06	2.43E-04	1.15E-10
A44-hv14*	5.86E+06	2.13E-04	3.86E-11

【 0 3 3 4 】

【表 3 6】

抗ヒト IgG Fc チップ / ヒト PAI-1			
mAb/hPAI-1*	ka1 (1/Ms)	kd 1 (1/s)	KD (M)
A44-hv11/hPAI-1	1.57E+06	6.68E-05	4.25E-11
A44-hv12/hPAI-1	1.62E+06	6.70E-05	4.14E-11
A44-hv13/hPAI-1	1.54E+06	2.52E-05	1.64E-11
A44-hv14/hPAI-1	1.25E+06	3.42E-05	2.70E-11

抗ヒト IgG Fc チップ / カニクイザル PAI-1			
mAb/cPAI-1*	ka1 (1/Ms)	kd 1 (1/s)	KD (M)
A44-hv11/hPAI-1	1.87E+06	5.60E-05	3.00E-11
A44-hv12/hPAI-1	2.24E+06	5.45E-05	2.44E-11
A44-hv13/hPAI-1	1.89E+06	5.08E-05	2.70E-11
A44-hv14/hPAI-1	2.32E+06	2.69E-05	1.15E-11

n/a は、変異体がビトロネクチン/PAI-1 複合体に効果的に結合しなかったということを意味する

*1:1 分子相互作用モデル

** 2 状態反応(コンホーメーション変化)モデル

【0335】

Biacoreデータは、ヒト化変異体間で有意な差異を示さなかった。変異体 8 を除く全てのヒト化変異体は、カニクイザルPAI-1及びヒトPAI-1の両方に対して親和性を示し、そしてPAI-1はビトロネクチンと許容しうる範囲内で複合体化した。親A44と比較して、ヒト化は抗体親和性を変化しないようであった。ヒト化変異体の親和性及び有効性は発色アッセイ及びBiacoreアッセイにおいて有意に異ならなかったが、細胞アッセイにおいてプラスミン生成を回復する変異体の能力は、いくつかの変異体について親マウス抗体よりも有意に低かった(以下の発色アッセイ及び細胞アッセイの比較をまとめた表27を参照のこと)。ヒト化変異体11~14を、細胞アッセイにおいてPAI-1をブロックする能力について試験した。

【0336】

10

20

30

【表 3 7】

表 27: プラスミン生成におけるヒト化変異体 11～14 の特徴付け

プラスミノーゲン活性化			
mAb	IC50 (nM)	Y50%	n
A44	3.13	79.79	6
A44-hv11	2.01	85.82	6
A44-hv12	1.99	76.70	6
A44-hv13	1.82	71.10	6
A44-hv14	1.82	61.22	6
A44-hv9	1.51	50.92	4
A44-hv1	2.08	58.50	2

10

20

【0337】

変異体 11～14 は、プラスミン生成アッセイにおいて良好な効力を示し、そしてさらなるインビトロアッセイにおいてさらに特徴付けされた。

【0338】

8) ヒト肝臓におけるヒト化変異体の特徴付け

ヒト化変異体 11～14 のさらなるスクリーニングを、内因的に產生されたヒトPAI-1を使用してヒト血漿及びヒト線維性肝臓サンプルから行った。PAI-1活性を、96 ウェルプレートに固定されたウロキナーゼと安定な複合体を形成するこのセルピンの能力を測定することにより評価した。未結合のPAI-1を洗浄した後、uPA-PAI-1複合体を、ポリクローナル抗PAI-1抗体の使用により検出した。次いで、結合したポリクローナル抗PAI-1抗体(これはサンプル中の活性PAI-1に比例する)を、二次抗体に結合した西洋ワサビペルオキシダーゼ (Molecular Innovation Cat. No. HPAIKT)を使用して検出した。様々な濃度のA44ヒト化変異体を、ヒト又はカニクイザル組み換えPAI-1(0.31nM最終濃度)のいずれかと室温で 15 分間インキュベートし、次いで上記のELISAを使用してuPA-PAI-1複合体により機能的活性PAI-1について試験した。サンプルをヒトPAI-1標準と比較した。高活性PAI-1レベルを有する高BMI患者からのヒト血漿を 4 倍希釈し、そして増加する量のA44ヒト化変異体とともにインキュベートした。残りの活性PAI-1レベルを、ELISAにより検出されたuPA-PAI-1複合体を使用して決定した。カニクイザル組み換えPAI-1中和もまた、プラスミン生成により試験して交差反応性を確認した。

30

40

【0339】

【表38】

表28: 内因性PAI-1活性をブロックするヒト化変異体の能力

hPAI-1 標準			ヒト血漿 TH1782				カニクイザルPAI-1		
IC50(nM)	Y50%	n	mAb	IC50(nM)	Y50%	N	IC50(nM)	Y50%	n
1.31E-01	50.80	2	A44-hv11	1.57E-02	37.50	2	4.24E-02	50.80	2
1.14E-01	53.45	2	A44-hv12	3.35E-03	37.68	2	2.66E-02	53.45	2
1.66E-01	52.82	2	A44-hv13	3.11E-02	61.35	2	2.81E-02	52.82	2
5.63E-02	52.47	2	A44-hv14	5.86E-02	73.90	2	2.87E-02	52.47	2

10

【0340】

ヒト線維性肝臓サンプル(肝臓結腸転移の外科切除からBiopredic International、Rennes、Franceにより提供される)を以下のようにホモジナイズした:計量した凍結肝臓サンプルを、セラミックビーズ(Cat No 03961-1-003、Bertin Technology、France)を入れた乾燥チューブ中でPrecellysホモジナイザー(Bertin Technology、France;4 、6800rpmで2x30秒)を使用してホモジナイズし、次いで1ml/gの溶解緩衝液(NaCl TBS中1.5M-Tris緩衝液0.1M Tris+0.15M NaCl pH7.4)を使用して溶解した。4 で5000gにて10分間の遠心分離後に、上清中の肝臓溶解物を採取し、そして-80 で凍結して貯蔵した。標準的BCAアッセイを使用した総タンパク質濃度並びに活性及び総PAI-1レベル(Mol Innov カタログ番号HP AIKT及びカタログ番号MPAIKT-TOTにより提供されるUK-PAI複合ELISAにより決定される)を、Biostat Calibrationソフトウェアを使用してA450nmに対して標準ヒトPAI-1濃度をプロットすることにより製造者の指示に従って行った。2.5nMの活性PAI-1まで希釈された肝臓溶解物とともにインキュベートした増加する濃度のA44ヒト化変異体を、以前に記載されるように評価してデータを分析した。PAI-1活性の阻害(mAbを用いないPAI-1活性は0%阻害であり、IgG1ではPAI-1の有意でかつ用量依存性の阻害は発生しなかった)を各mAb濃度について計算した。PAI-1活性の阻害パーセントをmAb濃度の関数としてプロットし、そしてIC50を決定し、ImaxはBiostat speedソフトウェアを使用した。データを図17及び表29に示す。

20

【0341】

30

【表39】

表29: ヒト肝臓におけるA44-hv11によるPAI-1活性中和

	IC50 (nM)	Imax (%)
A44-hv11 (1 nM)	0.0365	99.997
A44-hv11 (2 nM)	0.0503	99.99
A44-hv11 (3 nM)	0.0465	99.99
平均 +/- sem	0.0444 +/- 0.004	99.99

40

【0342】

上のデータに基いて、A44-hv11を、追加の構造研究並びに追加のインビトロ及びインビトロ研究におけるさらなる特徴付けのために選択した。

【0343】

実施例13: グラフティングによるAPG抗体のヒト化

グラフティング技術を使用したヒト化は以前に報告されている(P. T. Jones、et al.、Nature 1986、321:522-525)。抗PAI1マウス抗体APGのヒト化は、独国特許出願第DE200015

50

3251号からのマウス軽鎖(配列番号148)及びマウス重鎖(配列番号149)で開始した;このマウス抗体はDebrock et al.、Biochimica et Biophysica Acta、1337(2):257-266 (1997)にも記載されている。マウス抗体のHC及びLC鎖の生殖系列及び基準クラスを同定することにより、それぞれmuIGHV1-39及びmuIGKV14-111が得られた。次に、抗PAI1 APG可変ドメイン軽鎖及び重鎖に近いヒト生殖系列のリストを同定し、そして同一性パーセントによりランク付けした。両方の工程は、系統的に列挙される全てのヒト生殖系列に対してBLAST検索を実行することにより行われた(カッパ及びラムダ鎖についてのV及びJドメイン;重鎖についてのV、D及びJドメインの全ての可能な組み合わせ)。BLAST検索を、<http://www.imgt.org>で提供されるIMGT/DomainGapAlignツールを使用して実行した(Ehrenmann、et al. Cold Spring Harbor Protocols 2011.6 (2011)を参照のこと)。最も近いヒト生殖系列は、抗PAI1 APG可変ドメイン軽鎖及び重鎖に対してそれぞれ67.4%及び63.3%の配列同一性を有すると同定された。IMGTデータベースを使用して、軽鎖はHuIGHV1-33に近いことが見出され、そして重鎖はHuIGHV1-46に近かった。適合する基準クラスを有する抗PAI1 APG可変ドメイン重鎖に対して最も近いヒト生殖系列は、62.2%の配列同一性を有するHuIGHV7-4-1であると見出された。10

【 0 3 4 4 】

CDR領域(APGについてのKabat及びIMGTの組み合わせに基づく)及びVernier残基は、親マウスAPG(mAPG)軽鎖(配列番号148)、IGKV1-33-01_IGKJ4-01(IGKV1a)(配列番号107)及びIGKV1-33-01_IGKJ2-02(IGKV1b)(配列番号150)について斜字で示される(以下の表30を参照のこと)。Foote、et al. J. Mol. Biol. 224(2):487-99 (1992)において定義されるVernier残基は下線を引かれる。上で定義されたCDR及びVernier帶残基(mAPG配列においても下線を引かれる、表30)を除いて、2つの整列された配列の対比較を行うことによりヒト化変異(ボールド体)を得た。マウスAPG抗体に対してさらなる操作は行わなかった。これらのヒト化抗体をAPGv2及びAPGv4と名付けた。20

【 0 3 4 5 】

【表 4 0】

表 30: APG ヒト化配列

APG 軽鎖	D <u>I</u> K <u>L</u> TQSPSS MYASLGERVT ITC <u>K</u> ASQDIY <u>S</u> YLS <u>W</u> FQQKP GKSPK <u>T</u> LI <u>Y</u> R ANRLIDGVPS RFS <u>G</u> S <u>G</u> Q <u>D</u> <u>I</u> SLTISSLEY EHMGIYYCL <u>Q</u> YDEFPFTFGS GTKLEIK (配列番号 148)	
APG 重鎖	Q <u>V</u> KLQESGP <u>E</u> LVKPGASVKI SCKAS <u>C</u> YS <u>F</u> T DYNM <u>N</u> WVKQS KGKSLE <u>W</u> IG <u>I</u> IHPNSGTTTY NQKF <u>K</u> G <u>K</u> AT <u>L</u> T <u>I</u> D <u>Q</u> SSSTAY LQLNSLTSED SAVYYC <u>A</u> RS <u>K</u> LRFFDIWGQQ TTVTVSS (配列番号 149)	10
IGKV1-33-01_I GKJ4-01 (IGKV1a)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPLTFGG GTKVEIK (配列番号 107)	20
IGKV1-33-01_I IGKJ2-02 (IGKV1b)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPCSFQ GTKLEIK (配列番号 150)	
IGHV7-4-1-02_I IGHJ4-03	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTN TGNPTYAQGFTGRFVFSLTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARxxxxxYFDYW GQGTLTVSS (配列番号 151)	30
IGHV1-46-01_I IGHJ4-03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMMHWVRQAPGQGLEWMGIINPS GGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARxxxxxYFDYW GQGTLTVSS (配列番号 152)	

【 0 3 4 6 】

40

【表41】

APGv2_VL2	D I QLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIY SYLS W QQKP GKAPK T LIYR AN RLIDGVPS RFS G G G QD YFTISSLQP EDIATYYC LQ YDEFPFT FGQ GTKLEIK (配列番号 153)	
APGv2_VH2	Q V QLVQSGSE LKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLE W GI IHPNSGTTTY NQKFKGR A V L S V D Q SVSTAY LQISSLKAED TAVYYC A RSK LRFFD Y WGQG TLTVSS (配列番号 154)	10
APGv4_VH4	Q V QLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLE W GI IHPNSGTT TY NQKFKGR A T L T V D Q STSTAY MELSSLRSED TAVYYC A RSK LRFFD Y WGQG TLTVSS (配列番号 155)	20

【0347】

操作された配列

4Dヒト化及びグラフティングアプローチを、上記のヒト生殖系列配列マッチに適用した。操作された軽鎖配列については、APGv2はヒトIGKV1-33生殖系列に接合されたマウス軽鎖CDRを含有する(IGKV1-33-01_IGKJ2-01を用いてAPGv2胚性インデックス=94%)。操作された重鎖配列については、APGv2及びAPGv4は、それぞれヒトIGHV7-4-1及びIGHV1-46生殖系列に接合されたマウス重鎖CDRを含有する(APG_VH2胚性インデックス=IGHV7-4-1-02_IGHD6-25-01_IGHJ4-02で91%;APG_VH4胚性インデックス=IGHV1-46-01_IGHD6-25-01_IGHJ4-02)で91%。上の表30を参照のこと。

【0348】

重鎖及び軽鎖変異体配列の組み合わせ

グラフティングのために、1つのバージョンの軽鎖(APGv2_VL2; 配列番号153)及び2つのバージョンの重鎖(APGv2_VH2; 配列番号154及びAPGv4_VH4; 配列番号155)を作製した。APG_VL2は、最も近い生殖系列配列へのグラフティングから誘導された15の変異を含有し、マウスCDR及びVernier帶残基を保持する。APG_VH2は、適合する基準クラスを有する最も近い生殖系列配列へのグラフティングから誘導された21の変異を含有し、マウスCDR及びVernier帶残基を保持する。APG_VH4は、最も近いヒト生殖系列配列へのグラフティングから誘導された20の変異を含有し、マウスCDR及びVernier帶残基を保持する。このグラフティングプロトコルについてのCDRの限界設定は、文献において利用可能な様々な異なる定義に大まかに基づく。

【0349】

- APG_VL2 x APG_VH2 (CDR及びVernier領域を保持するグラフティングによるヒト化に対処する変異)
- APG_VL2 x APG_VH4(CDR及びVernier領域を保持するグラフティングによりヒト化に対処する変異)

2つのmAPG変異体は、このヒト化キャンペーンの間に生成され、これらはAPGv2及びAPGv4と名付けられた。これらの変異体を発現させ、そして以下に記載されるいくつかのインピトロアッセイにおいて特徴付けした。

【0350】

10

20

30

40

50

実施例14：表面プラズモン共鳴によるAPG抗体についての親和性動力学
ヒトグリコシル化PAI-1(GLYHPAI-A、Molecular Innovation)に対する親和性を、マウスAPG及び2つのヒト化変異体(APGv2及びAPGv4)についてBiacore 2000機器(GE Healthcare、Uppsala、Sweden)を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)により調べた。

【0351】

第一に、センサーチップCM5(GE Healthcare、Uppsala、Sweden)の表面を、マウス及びヒト抗Fc(抗ヒトIgG (Fc)抗体及び抗マウスIgG抗体キット、GE Healthcare)の捕捉のための通常のアミンカップリングを使用して準備した。全てのモノクローナル抗体(mAb)を、HB-EPランニングバッファを使用して5nMに希釈した。各々の精製されたmAbを、3分間異なるフローセル表面上に捕捉した。ヒトPAI-1を様々な濃度(2.5、5、10、20及び40nM)で注入し、中間に短い解離時間及び最後に長い解離時間用いた(接触時間:120秒、短い解離:90秒;長い解離:1800秒、流量:50 μl/分)。各回の抗体-PAI-1結合後にグリシン-HC1、pH 1.7緩衝液によりチップを再生した。動力学データ分析を、Biacore BIAevaluationソフトウェアを使用して行った。センサーグラムを、参照フローセル値及びブランク緩衝液値を差し引くことにより二重参照した。センサーグラムを、局所R_{max}を用いたシミュレートした動力学1:1(Langmuir)モデルを使用してフィッティングした。(図19を参照のこと)。3つのAPG抗体についてのデータを表31に示す。

【0352】

【表42】

表31: Biacore逆アッセイによる結合動力学

20

抗体	ヒトPAI-1		
	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速度 kd (1/s)	親和性 KD (M)
APG	3.82E+06	4.32E-04	1.131E-10
APGv2	6.58E+06	2.69E-04	4.080E-11
APGv4	9.48E+06	3.59E-04	3.800E-11

【0353】

30

実施例15：ヒト血漿におけるAPG抗体の特徴付け

マウスAPG並びにヒト化変異体APGv2及びAPGv4を、本明細書に開示される機能性アッセイに従って、PAI-1をブロックするそれらの能力についてスクリーニングした(例えば、上位の実施例6及び9を参照のこと)。手短には、PAI-1活性を、96ウェル上に固定されたウロキナーゼと安定な複合体を形成するこのセルピンの能力により評価した。未結合のPAI-1を洗浄した後、uPA-PAI-1複合体を、ポリクローナル抗PAI-1抗体を使用することにより検出した。次いで、結合したポリクローナル抗PAI-1抗体(サンプル中の活性PAI-1に比例する)を、二次抗体に結合された西洋ワサビペルオキシダーゼを使用して製造者の指示に従って検出した(Molecular Innovation、カタログ番号HPAIKT)。

【0354】

40

様々な濃度のAPGヒト化変異体(APGv2、APGv4)又は親マウスAPG抗体を、15分間室温で、高活性PAI-1レベルを有する未希釈のヒト血漿とインキュベートした。残留活性PAI-1レベルを、uPA-PAI-1複合体検出を使用してELISAにより(例えば、実施例6を参照のこと)製造者の指示に従って決定した。

【0355】

PAI-1活性の阻害を、各mAb濃度について計算した。PAI-1活性の阻害パーセントを、APGヒト化変異体(APGv2、APGv4)又は親マウスAPG抗体の濃度の関数としてプロットした。Bio stat speedソフトウェアを使用して、3つの独立した実験(二連で)の後にIC₅₀及びI_{max}を決定した(図20を参照のこと)。データを以下の表32に示す。

【0356】

50

【表43】

表32: ヒト血漿におけるプラスミノーゲン生成

抗体	IC _{50abs} 平均± sem (nM)	I _{max} 平均(%)
mAPG	1.81	89.7
APGv2	9.62 E-1	94.5
APGv4	1.28	94.4

【0357】

実施例16: ヒト血漿における血餅溶解アッセイ:A44V11、mAPG、及びAPG変異体活性纖維素溶解系は、脳卒中を有する患者においてしばしば変化する。血餅溶解アッセイは、フィブリン分解の程度を測定することにより線維素溶解活性を決定するために使用され得る。一般的には、Lindgren、A. et al. Stroke 27:1066-1071 (1996)を参照のこと。血餅溶解アッセイは他所で詳細に記載されている。例えば、Beebe、et al. Thromb. Res. 47:123-8 (1987); Tilley et al.、J. Vis. Exp. 67:e3822を参照のこと。

【0358】

A44V11及び他のPAI-1中和抗体の機能的活性を、ヒト血漿血餅溶解アッセイを使用して決定した。手短には、ここで適用されるアッセイは、tPA及び血餅溶解を阻害することが知られている濃度のPAI-1の存在下で組織因子/Ca²⁺の混合物を使用して血餅形成を誘導する。フィブリン重合は、340nmでの吸光度測定により検出された比濁法(turbidimetry)の増加を誘導する。抗体が血餅溶解を回復する能力を、正常ヒト血小板欠乏血漿と、増加する濃度の抗体をインキュベートすることにより決定した。

【0359】

手短には、血餅溶解実験はマイクロタイプレートで行われた。クエン酸(Citrate)ヒト血漿(Biopredic International、Rennes、France)を、アッセイ緩衝液(NaCl、Tris-HCl pH=7.4)中に希釈した抗PAI-1抗体又はアイソタイプコントロールIgGとともにインキュベートした。室温で15分間インキュベートした後、ヒトグリコシリ化PAI-1(GLYHPAI-A、Molecular Innovation)を最終濃度3nMまで加え、そしてさらに10分間インキュベートした。次いでt-PA(sctPA、Molecular Innovation)を、最終濃度1nMまで加えた。血餅形成を、カルシウムアッセイ緩衝液(CaCl₂)中7.5mMの最終濃度に希釈された組織因子(Innovin^(R)、Siemens Healthcare Diagnostics、Marburg、Germany)を含む活性化混合物により誘導した。

【0360】

340nmでの吸光度の動的読み取りを、iEMSマイクロプレートリーダー(ThermoFischer)又はSpectrostarNano(BMG Labtech)を用いて30秒ごとに5時間行った。血餅溶解に対する効果を定量するため、血餅形成と血餅溶解との間のバランスを反映する曲線下面積(AUC)を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して計算した。抗体処理後の血餅溶解の回復を、以下の計算に従って決定した:

【数1】

$$\text{回復} = 100 \times \frac{AUC_{\text{最大溶解}} - AUC_{\text{処理}}}{AUC_{\text{溶解なし}} - AUC_{\text{最大溶解}}}$$

IC₅₀及びI_{max}を、Biostat speedソフトウェアを使用して計算した。

【0361】

1nM濃度のt-PAは、2時間以内の正常血漿の完全な溶解を生じた。3nM濃度のPAI-1は、t-PA誘導血餅溶解を阻害した。t-PA又はPAI-1のいずれかのみ添加は血餅形成に影響を及ぼさなかった。t-PA又はPAI-1のどちらも添加しないと血餅形成に影響を及ぼさなかった。

【0362】

10

20

30

40

50

A44V11抗PAI-1抗体は、ヒト血小板欠乏血漿血餅溶解を回復したが(図21を参照のこと)、アイソタイプIgG1は回復しなかった(図22を参照のこと)。A44V11は、100nMで103%の I_{max} とともに2nMの IC_{50} を示した(図23を参照のこと)。

【0363】

APG抗PAI-1抗体のヒト化変異体もまた、ヒト血小板欠乏血漿血餅溶解を回復した(図24を参照のこと)。APGv2は、2.1nMの IC_{50} 及び114%の I_{max} を100nMで示した。APGv4は、2.8nMの IC_{50} 及び116%の I_{max} を100nMで示した(図25を参照のこと)。血餅溶解データを以下の表33にまとめる。

【0364】

【表44】

10

表33: 抗PAI-1抗体による血餅溶解の阻害

抗体	IC_{50} (nM)	$I_{max} @ 100 nM$
A44V11	1.38	113%
APG V2	2.08	114%
APG V4	2.82	116%
mAPG	2.34	123%

【0365】

20

実施例17：初代ヒト肺細胞におけるPAI-1のA44V11中和の評価

PAI-1の中和に対する抗体A44V11の効果を、肺細胞ベースの系で調べた。TGF- β は、最も協力で広範な線維形成促進性サイトカインであると考えられた。TGF- β は、PAI-1発現を誘導し、そしてt-PA及びプラスミンの活性、さらには培養されたマウス胚線維芽細胞(NIH3T3細胞)におけるコラーゲン分解を誘導することが示された。Liu, R.-M. Antioxid Redox Signal. 10(2): 303-319 (2008)を参照のこと。ATCC (Manassas, Virginia)からの初代肺線維芽細胞系統LL29(CCL-134)及びLL97A(CCL-191)を、12ウェルプレートで1ウェルあたり200,000細胞で終夜プレーティングした。細胞を、A44V11抗体又はアイソタイプコントロール(IgG)及びTGF- β (R&D Systems, Minneapolis, Minn.、カタログ番号100-B-001)とともに5ng/mlの濃度で48時間インキュベートした。48時間後、細胞上清を採取し、そしてウェスタンプロットによりPAI-1形態の検出のためにウサギpAb抗PAI-1(abcam、ab66705)を用いて分析した。

【0366】

30

TGF- β 刺激後にA44V11抗体で処理された細胞は、二重線としてPAI-1バンドを示し、これはPAI-1の切断された形態に対応する(図26、レーン5を参照のこと)。対照IgGで処理された細胞は、この二重線形成を示さない(図26、レーン6)。この研究は、A44V11での初代ヒト肺細胞の処理が、内因性PAI-1基質コンホメーションを誘導し、これによりPAI-1がプロテアーゼにより切断されることが可能となる。

【0367】

実施例18：A44V11はMMPの活性化を増加させる

40

プラスミンは、線維性組織の主要なタンパク質性成分であるコラーゲンを含む大部分のECMタンパク質を分解することができる酵素であるMMPを活性化する。この点において、プラスミンはしばしばMMPの一般活性化因子として挙げられる(Loskutoff, et al. J. Clin. Invest. 106(12):1441-43 (2000)を参照のこと)。PAI-1は、プラスミン生成をブロックし、続いて線維芽細胞アポトーシスを阻害することによりMMP活性化及びマトリックス分解を減少させる。MMPの活性化を刺激するA44V11の能力を、肺細胞ベースの系で調べた。ATCC (Manassas, Virginia)からの初代肺線維芽細胞LL29(CCL-134)及びLL97A(CCL-191)を、12ウェルプレートにおいて1ウェルあたり250,000細胞の濃度で終夜プレーティングした。細胞を48時間A44V11又はアイソタイプコントロール(IgG)及びLys-プラスミノーゲン(Molecular Innovation、カタログ番号HGPG-712)とともに0.1 μ Mの濃度でインキュベー

50

トした。48時間後、細胞上清を採取し、そして様々なMMP(例えば、MMP-1、2、3、7、8、9、12、13、及び14を含む)の活性を、Sensolyte 520 Generic MMPアッセイキット(AnaSpec、Fremont、CA、カタログ番号71158)を使用して製造者の指示に従って検出した。

【0368】

図27に示されるように、A44V11はヒト肺線維芽細胞においてプラスミン依存性MMPの活性化を刺激する。この図表は、2つの代表的な別々の実験を示す。A44V11及びプラスミノーゲンで処理された細胞は、陰性IgG1抗体で処理された細胞と比較して、実質的に増加した活性化を示した。この研究は、A44V11がプラスミン媒介現象においてMMPを活性を刺激するということを実証する。

【0369】

実施例19：肺線維症マウスモデル(ブレオマイシンチャレンジ)におけるA44V11の有効性の分析

ブレオマイシンにより誘導される実験的肺線維症は、十分な文献により支持される線維化の十分に研究されたモデルである。肺線維症のこのモデルは、ヒトにおいて見られるものに類似しており、そして潜在的治療剤の効果さらには基本的研究を評価するために使用されている(例えば、Molina-Molina et al. Thorax 61:604-610 (2006)を参照のこと)。

【0370】

ブレオマイシン処置マウス(線維症モデル)における薬力学的研究

ヒトPAI-1を発現するトランスジェニックマウス(ヒト化PAI-1トランスジェニックマウス)を、マウスPAI-1(SERPINE1)遺伝子CDS(エクソン及びイントロン)(NCBI Ref. No. NM_008871)を対応するヒト野生型PAI-1遺伝子CDS(NCBI参照番号NM_000602.3; NC_000007.13)(Klinger, K.W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8548 (1987)を参照のこと)で、内因性マウスPAI-1遺伝子制御配列の制御下でC57BL/6 x 129マウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)において置き換えることにより生成した。分子クローニング及びトランスジェニックマウスの生成は、従来の技術に従って、そして製造者及びブリーダーの指示に従って行われた。ヒトPAI-1の発現及びマウスPAI-1の非発現は接合マウスにおいて確認された。mRNA及びタンパク質レベルの両方が、それぞれ標準的qPCR及びELISAにより確認された。8~9週齢体重22~25gの雌性接合ヒト化PAI-1トランスジェニックマウスを、これらの手順に使用した。齧歯動物食餌及び水を自由に与えた。

【0371】

マウスに、0.9% NaClに溶解したBleomycin^(R) (Sanofi, France)50 μlを、マイクロスペイサー(microsprayer)による気管内注射により2mg/kgの用量で投与した。対照マウスに0.9% NaCl 50 μlを投与した。これらの手順のために、マウスをイソフルラン(TEM, Lormont, France)で吸入により麻酔し、次いで18Gカニューレを挿管した。カニューレを酸素/イソフルラン混合物を供給した人工呼吸器に接続して麻酔を維持した。麻酔後に、microsprayerをブレオマイシン注入のために肺に直接カニューレで導入した。次いでマウスを抜管して麻酔から回復させた。4日目に、3つの群で無作為化した後、PBS中10mg/kg(1mg/ml)でのA44v11又は陰性対照マウスIgG1のいずれかの腹腔内投与により1回処置した。

【0372】

ブレオマイシンチャレンジ後の指定された時点(7日目又は9日目)に、マウスをキシラジン/ケタミン混合物で麻酔し、そして開胸により安楽死させた。クエン酸被覆チューブでの心臓内採取により血液収集を行った。左気管支をクランプし、そして左肺を取り出し、組織学的分析のために制御された圧力下で固定器(FineFix^(R)、Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL)を用いて固定した。次いでカニューレを、気管支肺胞洗浄(BAL)手技(0.9%NaCl 1.5mlを注入し、そして0.5mlの3回の注射で回収)のために気管中に配置した。次いで右肺の4つの葉を採取し、2つに切り、そしてタンパク質分析のために溶解した。全ての実験は欧州倫理法(European ethical laws)に従って行われ、内部倫理礼譲(internal ethical comity)(CEPAL, sanofi)により認められた。

【0373】

A44V11レベルを、被覆ビオチン化ヒトPAI-1プレートを用いてELISA(Molecular Innovat

10

20

30

40

50

ion、カタログ番号HPAIKT)を使用して決定し、そしてスルホタグ標識された二次抗マウス IgGを使用して検出した(MesoScale Discovery、Gaithersburg、Maryland)。7日間、マウスをA44V11で処置し、結果は血漿中200nM、BALF中11nM、そして肺溶解物中12nMであった。

【0374】

図28に示されるように、4日目の単回腹腔内用量(10mg/kg)のA44V11の投与は、ブレオマイシンチャレンジの7日後に屠殺された動物におけるBAL液及び肺溶解物の阻害においてヒト活性PAI-1のほとんど完全な阻害を達成した。9日目の動物について、A44V11(10mg/kg)は肺溶解物においてヒト活性PAI-1のほとんど完全な阻害を達成するが、BALFにおいて部分的な阻害しか達成しなかった。

10

【0375】

フィブリン分解産物であるD-ダイマーは、フィブリン分解の程度を評価するために測定され得る。フィブリン分解を測定するために、BALF中のD-ダイマーのレベルをELISA(Asse rachrom D-Di、Diagnostica Stago、Asnieres、France)により製造者の指示に従って検出した。A44V11処置群のBALF中のD-ダイマーレベルは、IgG1陰性対照群と比較した場合に、7日目に約2.8倍、そして9日目に1.6倍増加し、A44V11処置がフィブリン分解を増加させるということを示唆した(図29を参照のこと)。

【0376】

ブレオマイシンでチャレンジしたマウス肺における線維症の減少におけるA44V11活性をさらに評価するためにさらなる研究を行った。これらの研究のために、研究期間の長さがブレオマイシンチャレンジから21日であり、かつ抗体での処置(10mg/kgでのA44V11又はIgG1対照抗体のいずれか)が4日目に開始して20日目まで3日ごとに繰り返されたことを除いて、上記の薬力学研究と類似したプロトコルをマウスに受けさせた。ブレオマイシンチャレンジ後21日目に、動物を上記のように屠殺した。

20

【0377】

肺重量の増加は、増加した線維症の指標であることが知られている。線維症の尺度としての右肺重量を、全ての実験群においてマウスについて決定した。図30に示されるように、ブレオマイシン滴下注入は、10mg/kgでのA44V11抗体の繰り返し投薬により部分的に阻害された右肺重量の増加を誘導する。IgG1陰性対照抗体を使用した繰り返し投薬は、ブレオマイシンチャレンジに起因する右肺重量の増加を阻害しなかった。A44V11処置マウスにおけるブレオマイシン誘導右肺重量増加の減少は、IgG1陰性対照抗体で処置された同様のブレオマイシン誘導マウスと比較した場合に、統計的に有意であった($p<0.001$)。統計分析を、1要因ANOVA、続いてNewman-Keuls検定により行った。この結果は、A44V11がヒト化PAI-1マウス肺におけるブレオマイシン誘導線維症を阻害するが、対照IgG1抗体は阻害しないということを示す。

30

【0378】

肺におけるコラーゲン蓄積は、線維症の別の公知の指標である。コラーゲン蓄積をアッセイするために、21日目に屠殺したマウスからの肺組織を準備し、HPLCにより分離し、続いてヒドロキシプロリンを測定した。この技術は他所、例えばHattori, et al. J Clin Invest. 106(11):1341-1350 (2000)で詳述される。手短には、肺組織を酸性条件(6M HCl)下で22時間105℃にて加水分解し、続いてエバボレートすることにより準備した。第一級アミンは、OPA(フタルアルデヒド)により肺組織においてブロックされ、そしてプロリン/ヒドロキシプロリンは、NBD(4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン)(Santa Cruz Biotech.、Santa Cruz、CA)を使用して特異的に標識された。次いで加水分解産物を、SynergiTM 4 μm Hydro-RP 80、LC Column 150 × 3mmカラム(Phenomenex、Torrance、CA、カタログ番号00F-4375-Y0)でHPLC(Shimazu Corp.、Kyoto、Japan)をアセトニトリルグラジエント下で分離した。既知の量のヒドロキシプロリンの標準曲線を、ピークを定量するために参考として使用した。定量されたデータの代表を図31に示す。

40

【0379】

ヒドロキシプロリン含有量により検出された肺コラーゲン蓄積は、ブレオマイシンチャ

50

レンジ動物において増加した。肺コラーゲン蓄積のこの増加は、of 10mg/kgでのA44V11抗体の繰り返し投薬により統計的に減少した($p<0.08$) (図31を参照のこと)。IgG1陰性対照抗体を使用した繰り返し投薬は、ブレオマイシンチャレンジに起因する肺コラーゲン蓄積の増加を阻害しなかった。A44V11処置マウスにおけるブレオマイシン誘導コラーゲン蓄積増加の減少は、IgG1陰性対照抗体で処置された同様のブレオマイシン誘導マウスと比較した場合に統計的に有意であった($p<0.05$)。A44V11処置マウスは、IgG1対照処置マウスよりも約44%少ない、コラーゲン蓄積の増加を示した。

【0380】

実施例20：サルにおけるLPSチャレンジモデルにおけるA44V11活性の評価

サルにおける急性リポ多糖(LPS)チャレンジモデルを、インビボでのA44V11のPAI-1中和有効性を決定するために適用した。LPSチャレンジモデルは、Hattori, et al. J Clin Invest. 106(11):1341-1350 (2000)に記載されている。サル血漿及び肝臓サンプルにおけるA44V11 mAbのPAI-1に対する活性を評価した。具体的には、実験は、A44V11(5mg/kg、IP)又はIgG1(陰性対照、5mg/kg、腹腔内投与)のいずれかで予め処置された(24時間前)麻酔したサルにおけるPAI-1の血漿及び組織レベルに対する高容量のLPS(100 μg/kg-IV)の影響を評価するように設計された。実験は欧州倫理法(European ethical laws)に従って行われ、内部倫理礼譲(internal ethical comity)(CEPAL、sanofi)により認められた。

【0381】

体重4～9kgのカニクイザル(Cynomolgus Macaca fascicularis)(雄性及び雌性)を、長期麻酔(少なくとも8時間)前に終夜絶食させ、これは Zoletil50(Virbac、Taguig City, Philippines)の0.12～0.16mL/kgでの筋内(IM)導入、続いて空気/酸素及びイソフルラン(1～3%)の気体混合物の吸入を含んでいた。サルの体温を加熱パッドを使用して生理的範囲内に維持した。カテーテル挿入後、LPS(Serotype 0127-B8)を、副橈側皮静脈(cephalic accessory vein)において1分のボーラスとして100 μg/kg(0.4 mL/kg)の用量で投与した。様々な時点で、血液サンプル及び肝臓サンプルを採取した。血液サンプル(クエン酸/EDTA)を採取し、そして遠心分離して血小板欠乏血漿を単離した。肝臓生検及び終末剖検(terminal necropsy)を-80°で貯蔵した。

【0382】

活性PAI-1、D-ダイマー及びプラスミン-2抗プラスミンレベルを、市販のELISAアッセイ(Mol. Innovation、カタログ番号HPAIKT; Asserachrom D-Dimer; Plasmin-A2 antiplasmin、Diagnostica Stago)を使用して製造者の指示に従って決定した。

【0383】

血漿中で、A44V11を投与された全てのサルにおいて、活性PAI-1レベルは約30ng/mlから10ng/ml未満に減少した(図32(A)を参照のこと)。LPS投与(100ug/kg)後の活性PAI-1レベルの増加はなかった(図32(A)を参照のこと)。対照的に、陰性IgG1対照で処置されたサルは、LPS投与後の活性PAI-1レベルの強い増加を示し、最大値は約4時間の時点で発生した(約50～約250ng/ml)。(図32(B)を参照のこと)。従って、陰性IgG1対照での処置は、LPS投与後に強く増加した血漿中の活性PAI-1レベルを減少させない(図32(B)を参照のこと)。

【0384】

肝臓生検溶解物において、同様の現象が観察された。A44V11 mAbで処置されたサルは、LPS処置後の活性PAI-1レベルの増加を示さなかった。(図33(A))。対照的に、LPS投与は、陰性IgG1対照処置サルからの肝臓生検溶解物中の活性PAI-1の強い増加(3ng/mgまで)を誘導した。(図33(B)を参照のこと)。

【0385】

PAI-1中和と同時に、A44V11処置サルにおけるD-ダイマーレベル(図34(A)を参照のこと)は、一般に陰性IgG対照処置サルより高いことが見出され(図34(B)を参照のこと)、従ってサルにおけるA44V11処置が血漿におけるフィブリン分解の増加も誘導するということを示唆した。

【0386】

最後に、A44V11処置サルの血漿サンプルは、陰性IgG対照処置サルにおけるPAPレベルと

10

20

30

40

50

比較した場合、プラスミン-2抗プラスミン(PAP)複合体の増加したレベルを示した。(図35(A)及び(B)を参照のこと)。PAP複合体及びD-ダイマーのA44V11の存在下での増加は、プラスミン生成の増加を示す。

【0387】

実施例21：腹部癒着マウスモデルにおけるA44V11活性の評価

抗PAI-1抗体A44V11での処置の癒着形成に対する効果を、外科的傷害のマウス子宮角モデルにおいて評価した。マウス子宮角接近(approximation)及び電気焼灼手技は、漿膜表面を分断し、子宮組織に熱損傷を引き起こし、そして治癒プロセスの間に損傷組織表面に接近し、これが最終的に未処置の動物の100%において術後癒着を生じる。モデル及び手術手順は、Haney A.F. et al.、(1993). *Fertility and Sterility*、60(3): 550-558に以前に記載されている。

10

【0388】

これらの癒着研究のために、PAI-1導入遺伝子を発現する上で生成された約9週齢の体重約20gのヒト化トランスジェニック雌性マウスを使用した。42匹の成熟トランスジェニック雌性マウスを2つの群に分け、そしてHaney A.F. et al.、(1993)に詳細に記載されるように、子宮角(UH)の間に癒着を生じるように設計された外科手技にかけた。手短には、各動物をIACUCガイドラインに従って手術のためにイソフルランで麻酔し、そして所定の正中開腹術(midline laparotomy)を、剣状突起(xyphoid process)に対して約1.0cm尾側に行った。UHを確認し、筋肉壁を通して注意深く配置された各角の1つの7-0Prolene縫合(Ethicon Inc.、Somerville、N.J)を用いて内側に接近させ、そして角を子宮卵管境界(uterotubal junction)にて卵管接合部のすぐ下で一緒に結んだ。卵巣脈管供給を損傷しないように注意した。電気焼灼損傷を誘導するために、双極電気焼灼器ユニット(Valley Lab Surgistat、Solid state Electrosurgery Unit、モデル番号B-20)を約2x6mmの領域にわたって各子宮角の内側表面に使用した。焼灼器ユニットを以下のように設定した:ボルト100、130Hz、50-60アンペア。3mm幅の焼灼器先端を、3に設定した純粋な凝固電流で使用し、電圧供給(power)を開始し、そして1つの角あたり2つの熱傷スポットで1秒間接触させた。筋肉切開を5-0 Vicryl、BV-1テーパー針(Ethicon Inc.)を用いて連続縫合パターンで閉じた。皮膚を5-0 Prolene、BV-1テーパー針(Ethicon Inc.)を用いて水平マットレス縫合パターンで閉じた。

20

【0389】

UH損傷を作製した後、群1の動物を、体積0.16mLのアイソタイプ対照抗体(30mg/kg)で処置し、これは焼灼器熱傷に適用された。群2の動物を、同じやり方で体積0.16mLのA44V11抗体(30mg/kg)で処置した。各群について、動物を6時間(n=5)、72時間(n=4)、又は7日目(n=12)に安楽死させた。(以下の表34を参照のこと)。72時間と7日目に安楽死の予定を入れていた動物には、手術の48時間後に抗体の第二の用量(30mg/kg)を腹腔内(IP)注射した。

30

【0390】

【表45】

表34: 子宮角損傷研究のための処置スケジュール。

群	処置	安楽死の時点	動物の数	投薬 (30mg/kg)
群1	アイソタイプ対照 mAb (0.16 mL)	6 時間	5	時点 0
		72 時間	4	時点 0 + 48 時間
		7 日	12	時点 0 + 48 時間
群2	抗 PAI-1 A44 ヒト化 mAb (0.16 mL)	6 時間	5	時点 0
		72 時間	4	時点 0 + 48 時間
		7 日	12	時点 0 + 48 時間

注: 全ての動物は、縫合により子宮角を接近させられ、そして焼灼熱傷を処置前に作製されている。

【0391】

有効性評価及び分析:

示された時点に動物を安楽死させ、そして癒着の形成を評価した。手短には、角の長さを、子宮分岐 (uterine bifurcation) から卵管の直下に配置した接近縫合まで測定した。子宮角を囲む2つの外部縫合を除去し、そして子宮角間の癒着の長さを、顕微鏡を用いて測定し、文書で記録し、そして存在又は不在 (有り / 無し) として書き留めた。また、癒着形成に含まれるいづれの組織も記録するが、付着領域の長さには含まれないかもしれない。子宮角間の付着した長さの平均パーセントの分布を、Shapiro-Wilk検定を使用して正常性についてチェックした。これらの群を、正常に分布していた場合はTukey Kramer分析を使用して、そして正常に分布していなかった場合はWilcoxon順位和分析を使用して互いに比較した。全ての場合において、p値 0.05を統計的に有意とみなした。A44V11で処置された動物は、接近した子宮角間の癒着形成の長さの有意に低いパーセントを示した (表35を参照のこと)。

【0392】

【表46】

表35. 子宮角長測定結果

群	N	子宮角間の癒着を有する長さの% (平均 \pm SEM)
アイソタイプ対照 mAb (0.16 mL)	12	84 \pm 3
A44V11 mAb (0.16 mL)	11	61 \pm 7* (p=0.02)

*p=Wilcoxonb順位和分析、カイ二乗近似によりアイソタイプ対照と比較して統計的に有意

【0393】

活性PAI-1及びtPAレベルの検出

安楽死後に、評価のために動物の血液(血漿)、腹腔内液(IPF)、及び子宮角サンプルを集めた。サンプル収集は従来の技術を使用して行った。血漿、IPF、及び子宮角サンプルを、活性PAI-1及びtPAレベルについてELISAを使用して評価した。(Human PAI-1 Activity ELISAキット、カタログ番号HPAIKT、Molecular Innovations、Novi、MI)。データをExcel、JMP、及びPrism Graphパッケージウェアを使用して処理した。全ての場合において

10

20

30

40

50

、p値 0.05を統計的に有意とみなした。6時間及び7日の時点で、減少したレベルの活性PAI-1が、アイソタイプ対照に対してA44V11で処置された動物において腹腔内(IP)液及び子宮角溶解物において見られた。(図36を参照のこと)。アイソタイプ対照に対して、IP液中6時間での減少したレベルの活性PAI-1は、A44で処置された動物においてIP液中6時間の時点で示された統計的に有意な結果であった。(スチュードントt検定によりp<0.001)。

【0394】

実施例22：ヒト化抗体A44V11の結晶構造

Fab A44V11の発現及び精製

組み換えFab(rFab)を、一過性トランスフェクトしたHEK293細胞から、軽鎖又はC末端Hisタグ化重鎖をコードする2つのプラスミドを使用して得た。遠心分離及びフィルタリング後に、細胞上清からのrFabを固定化金属親和性樹脂に適用した。樹脂から溶出した後、rFabをPBSに対して広く透析して4℃で貯蔵した。

【0395】

カニクイザル(*Macaca fascicularis*)PAI-1(カニクイザル(*cynomolgous*)又はcyno PAI-1とも呼ばれる)の供給源：

組み換え成熟カニクイザルPAI-1(24-402)を、*E. coli*において封入体として発現させ、そして組み換えタンパク質を従来の方法を使用して精製した。

【0396】

ヒトPAI-1の供給源：

組み換え成熟ヒトPAI-1(24-402)をMolecular Innovations Inc. (カタログ番号CPAI)から購入した。これをBerkenpasら(1995, *EMBO J.*, 14, 2969-2977)により記載されるように、変異(N150H, K154T, Q319L, M354I)を導入することにより活性コンホーメーションで安定化させた。

【0397】

複合体の製造及び精製：

組み換えFab及び抗原を、1.5:1のモル比で混合し、30分間室温でインキュベートし、そして複合体を、25mM MES pH6.5、150mM NaClで平衡化したSuperdex 200 PGカラム(GE Healthcare)で分取サイズ排除によりさらに精製した。

【0398】

Fab A44V11+Cyno PAI-1複合体の結晶化

複合体を、10mg/mlまで25mM MES pH6.5、150mM NaCl中で濃縮した。16~24%エタノール、100mM Tris pH8.5中で結晶化した。エチレングリコール(30%)を凍結保護物質として使用した。結晶は、3.3Åに空間群P321(a=b=193Å, c=144Å)でESRFのID29ビームライン(beamline)で回折した。データをXDS及びScala(GlobalPhasing Ltd., Cambridge, UK)の組み合わせで処理した。

【0399】

複合体Fab A44V11/Cyno-PAI-1の構造決定：

Fab可変ドメインのモデルを、Maestro (Schrodinger, New York, NY)においてPrimeを使用して構築した。定常ドメインを、公開された構造3F02から得た。ヒトPAI-1の2つの異なるモデルを使用した：潜在コンホーメーションを1LJ5から得、活性コンホーメーションを1OC0から得た。Matthews計数(V_M 、タンパク質分子量の単位あたりの結晶体積)の計算は、非対称単位中に4つまでの複合体が存在することを示唆する(V_M 2.2により90キロダルトン(KD)の複合体サイズが推測される)。分子置換をPhaser(CCP4 suite)(McCoy, et al. *J. Appl. Cryst.* 40: 658-674 (2007)を使用して行い、これは潜在PAI-1の2つのモノマー及びFabの2つの可変ドメインを同定した。さらなる密度は定常ドメインについて明らかに現れ、これは手動で配置されなければならなかった。4.3の V_M (71%溶媒)に対応するこの解を、充填の一貫性についても注意深く調べた。構造をBuster(GlobalPhasing)を用いて非結晶学的対称性を使用してRfree29.2%(Rfactor 25.8%)まで精密化した。定常ドメインは、結晶充填により安定化されず、そして電子密度マップにおいて不十分に分解された。

【0400】

10

20

30

40

50

Fab A44V11+ヒトPAI-1複合体の結晶化

タンパク質結晶化は、X線結晶学法による生体分子構造決定の障害である。タンパク質結晶化の成功は、結晶化実験において使用されるタンパク質分子の品質に直接比例し、この場合、最も重要な品質基準は溶液中のタンパク質の純度及び均一性（分子及びコンホーメーションの両方）である。

【0401】

最初に、PAI-1/Fab mAb複合体構造を決定するために、天然mAb A44を使用して、パパイン消化によりそのFabフラグメントを製造した。このFab大規模製造は、複合体化してヒト野生型(wt)PAI-1タンパク質との複合体で精製される不均一Fabフラグメントを生じた。得られたタンパク質複合体を、7mg/ml濃度まで濃縮し、そして2つの異なる温度4 及び19 10

で800の個々の結晶化条件下で結晶化のためにスクリーニングした。結晶化にヒットするものは検出されなかった。タンパク質複合体均一性を改善するために、組み換え6-Hisタグ化Fab A44を製造し、生成し、そしてヒト野生型PAI-1タンパク質と複合体化させた（図36を参照のこと）。

【0402】

複合体結晶化スクリーニングは、20%PEG10K+0.1M酢酸ナトリウムpH4.6条件下で最初の結晶化ヒットという結果となった。従来の結晶化法による結晶化最適化、マイクロシードマトリックスシーディング（Microseed Matrix Seeding）、及びインサイチュトリプシン分解（Trypsinolysis）結晶化は、結晶の質を有意に改善しなかった。最も良好な得られた結晶は針状であり、構造決定には不十分な分解能（10 ）でX線を回折した。 20

【0403】

複合体結晶の結晶化での失敗は、複合体のコンホーメーション不均一性により潜在的に説明され得る。野生型PAI-1分子は、3つの異なるコンホーメーション（活性、潜在及び基質）を取ることが知られており、これが結晶化を妨害し得る。結晶の品質を改善するために、潜在PAI-1との複合体の6-Hisタグ化A44 Fabを製造した。（図37を参照のこと）。

【0404】

対応する複合体を製造し、そして6-Hisタグ化Fab A44/wt PAI-1タンパク質複合体に以前に使用した条件下で新たに結晶化についてスクリーニングした。試験した1000を超える条件からの唯一の結晶化ヒットは、20% PEG3350+0.2M nH4アセテート+4% MPD+50mM MES pH6の条件下の複合体について同定された（図39(a)を参照のこと）。広範の最適化後に3D結晶を得た。シンクロトロン高強度X線ビームを使用したX線回折試験は、回折の証拠を示さなかった（図39(b)を参照のこと、代表的な最適化された結晶を示す）。 30

【0405】

タンパク質の部分の可動性を減少させるために、A44 Fabフラグメントを組み換えにより製造することを決定したが、以前に使用した6-Hisのような人工的なタグは用いなかった。首尾良い結晶化のための機会をさらに増やすために、PAI-1の活性形態変異体（N150H、K154T、Q319L、M354I）をMolecular Innovations（カタログ番号CPAI、Novi、MI）から購入し、そして人工タグを欠いたFab A44タンパク質との複合体製造のために使用した。複合体を25mM MES pH 6.5、150mM NaCl中12mg/mlに濃縮した。許容しうる棒状の単結晶を10 % PEG3350、100mM硫酸アンモニウムで得て、30%エチレングリコールを加えることにより凍結保護した（図40を参照のこと）。これらの結晶は、3.7 に回折し、そして広範な凍結保護最適化後に、構造決定に適したX線回折データセットを得た（3.3 ）。データセットをシンクロトロンSOLEIL（Saint-Aubin、France）のビームラインProxima 1で3.3 までデータセットを集めた。空間群はP212121 (a=105、b=152 c=298)。データをXDSmeスクリプト（XDS ref、Xdsme ref）を使用して処理した。 40

【0406】

複合体Fab A44V11/ヒト-PAI-1の構造決定：

Pointless(CCP4)は、空間群認識において40%の信頼性しか示さなかった。結果として、最初の分子置換をAmore(CCP4)を用いて行い、P222点群の全ての可能な空間群変形を試験した：P212121は明確に確認された。Phaser (Phaser、CCP4)を用いた最終分子置換は、対 50

称性単位においてFabの活性PAI-1/可変ドメインの4つのダイマーを同定した。定常ドメインを電子密度マップに手動で加えた。構造をBuster(GlobalPhasing)を用いて非結晶学的対称性を使用して、Rfree 28%(Rfactor 24.1%)まで精密化した。

【0407】

エピトープ及びパラトープ構造解析

エピトープ及びパラトープ領域を、カニクイザル及びヒト複合体において形成されたと同定し、これらの複合体を比較した。結晶構造を、ヒト及びカニクイザルPAI-1との複合体のA44V11について3.3 Åまで決定した。両方の構造の重ねあわせ(図40を参照のこと)は、A44V11のパラトープがPAI-1の潜在形態及び活性形態の両方に類似しているということを示す。Fab A44は、ヒトPAI-1の活性形態及びカニクイザルPAI-1の潜在形態を認識した。図42は、活性ヒトPAI-1(図42(A))、及び潜在カニクイザルPAI-1(図42(B))の両方においてFab A44により認識されるPAI-1エピトープを示す。パラトープ認識潜在コンホーメーションは、活性コンホーメーションを認識するパラトープの一部である。

【0408】

相互作用の表面領域の分析から見られるように、PAI-1は主にA44V11の重鎖と相互作用する。活性ヒトPAI-1と重鎖との相互作用の表面積(4つの複合体の平均)は674 Å²である。活性ヒトPAI-1と軽鎖との間の相互作用の表面積(4つの複合体の平均)は372 Å²である。潜在カニクイザルPAI-1と重鎖との間の表面積(2つの複合体の平均)は703 Å²である。潜在カニクイザルPAI-1と軽鎖との間の相互作用の表面積(2つの複合体の平均)は360 Å²である。重鎖及び軽鎖のパラトープの描写についてはそれぞれ図43及び44を参照のこと。

【0409】

パラトープのA44V11部分の残基を以下の表36に示す。斜体の残基は活性PAI-1との相互作用に関与するが潜在形態とは関与せず、一方下線を引いた残基は潜在形態とだけ相互作用している。全ての他の残基は両方の接触面に関与する。

【0410】

【表47】

表36: PAI-1とのパラトープに関与するA44V11残基

位置	残基
重鎖(図43)	
ループH1	<i>Thr30</i> 、 <i>Asn31</i> 、 <i>Gly32</i> 、 <i>Tyr33</i> 及び <i>Asn35</i>
ループH2及び隣接するβ-ストランド	<i>Tyr47</i> 、 <i>Tyr50</i> 、 <i>Thr52</i> 、 <i>Tyr53</i> 、 <i>Ser54</i> 、 <u><i>Gly55</i></u> 、 <i>Ser56</i> 、 <i>Thr57</i> 及び <i>Tyr58</i>
ループH3	<i>Trp98</i> 、 <i>Tyr100</i> 及び <i>Tyr104</i>
軽鎖(図44)	
ループL1:	<i>Asn30</i> 及び <i>Tyr32</i>
ループL2:	<i>Arg50</i> 及び <i>Arg53</i>
ループL3:	<i>Tyr91</i> 、 <i>Asp92</i> 、 <u><i>Glu93</i></u> 、 <i>Phe94</i> 及び <i>Pro96</i>

【0411】

ヒト及びカニクイザルPAI-1分子の異なるコンホーメーションにもかかわらず、同じ残基がFab A44との相互作用に関与する(ヒトPAI-1の配列において以下に示される太字の残基)(配列番号1):

10

20

30

40

50

【化28】

VIHPPSYVAHLASDFGVRVQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTG
 GETQQQIQAAMGFKIDDKGMAPALRHYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDL
 KLVQGFMMPHFFRLFRSTVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMIHLGTGA
 VDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMMAQTNKF
 NYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLISHWK
 GNMTRLPRLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPL
 HVALALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIDRPFLFVVRHNPTGTV
 LFMGQVMEP

10

【0412】

ヒトPAI-1についてのA44V11結合エピトープの略記は以下のとおりである：

E-X-X-Q (配列番号156)；

L-X-R (配列番号157)；

T-D-X-X-R-Q-F-Q-A-D-F-T-X-X-S-D-Q-E-P-L (配列番号158)

【0413】

要約すれば、FabA44を認識するPAI-1のカニクイザル及びヒトエピトープは、両方のコンホメーションにおいて同一である。Fab A44はヒト及びカニクイザルPAI-1の両方を認識するが、マウスPAI-1もラットPAI-1も認識しないようである。

20

【0414】

実施例23： A44V11特異性及び交差反応性の決定

A44V11の特異性及び反応性を決定するために、A44V11エピトープの配列(上記参照)を使用して、ScanProsite (SIB Swiss Institute of Bioinformatics)データベースを用いたモチーフ検索を使用して他のタンパク質中の類似したエピトープを検索した。さらなる詳細については、Artimo, P. et al. Nucleic Acids Res. 40(W1):W597-603 (2012)を参照のこと。検索において見つけられた全てのエピトープ配列マッチはPAI-1に関連付けられ、A44V11抗体がPAI-1に特異的であることを示唆した。

【0415】

30

A44V11エピトープを、コンピュータプロファイリング及びMed-SuMoに従って分子モデリングを使用して、他の公知のx線構造(3D検索)とも比較し、これらは例えば水素結合、電荷、疎水性及び芳香族基を含む、タンパク質表面上の生化学的昨日を検出及び比較する。Med-SuMo分子モデリングは、Jambon, et al. Bioinformatics 21(20):3929-30 (2005)においてさらに記載される。A44V11エピトープの3D検索は、ヒトアルファ-1-抗トリプシン(AAT1)中の類似したモチーフを突き止めた。しかし、さらなる調査の際に、AAT1モチーフはA44V11エピトープとの間に、A44V11が結合しないような有意な差異を有することがわかった。従って、A44V11エピトープの配列パターン及び3Dパターン分析は、他のヒトタンパク質との最少の交差反応性があるだろうということを示唆する。

【0416】

40

A44V11についてのヒト及びカニクイザルPAI-1エピトープを、マウス及びラットPAI-1由来の帝産されたエピトープと比較した。配列は、配列番号1(PAI-1ヒト)、配列番号162(PAI-1カニクイザル)、配列番号163(PAI-1マウス)、及び配列番号164(PAI-1ラット)から抜粋された。ラット及びマウスPAI-1は、ヒトPAI-1とそれぞれ75%及び79%の配列同一性を有する。異なるPAI-1配列の整列は、それらのそれぞれのエピトープにおいてラット/マウスとヒト/カニクイザルとの間になお有意な差異を示し、A44V11がラットPAI-1もマウスPAI-1も認識しないようであるということを示唆する(図45を参照のこと)。例えば、マウスPAI-1アミノ酸Ser300、Thr302、Gln314は、ヒト/カニクイザルPAI-1対応物と異なる。これらの残基における差異は、マウスPAI-1はA44V11によって認識されることができないような、提案されたエピトープにおける変化を表す。複合体ヒトPAI-1/A44V11の構造とのマウス

50

PAI-1の構造比較(図46)は、A44V11抗体からヒト及びマウス活性の両方を得ることは不可能だろうということをさらに示す。

【0417】

A44V11について同定されたエピトープをさらに立証するために、ヒト及びカニクイザルA44V11エピトープを、ビブロネクチン(vibronectin)の結合領域と比較した。ビブロネクチン(vibronectin)のソマトメジンBドメインとの複合体のヒトPAI1の構造は公開されている(1OC0)。これら2つの複合体の構造を比較した(図47を参照のこと)。構造比較は、A44V11の結合がビブロネクチンとのPAI-1の相互作用に影響を及ぼさないことを示唆する。

【0418】

A44V11エピトープを、他の公開された抗PAI1抗体のエピトープと比較した。A44V11エピトープの重なりは他の公開された抗PAI-1抗体MA-55F4C2及びMA-33H1とは見られず、これらは128~156領域の残基に結合する(Debrock et al. Thromb Haemost, 79:597-601 (1998))。

【0419】

最後に、A44V11抗体の特異性及び交差反応性の欠如をBiacoreにより確認した。推定固有配列及びA44V11エピトープの3D構造に基づいて、分子モデル研究は、A44V11がヒト及びカニクイザルPAI-1に特異的であることを強く示す。

【0420】

実施例24：水素/重水素交換質量分析(HDX MS)によるエピトープマッピング
質量分析(MS)によりモニタリングした水素/重水素交換(HDX)を、本明細書に開示されるPAI-1結合抗体に適用して、各抗体のエピトープをさらに特徴付けした。HDX MSは、同じタンパク質の多数の状態を比較するために特に有用な技術である。タンパク質治療学へのHDX MSの詳細な方法論及び応用は、Wei, et al., Drug Discovery Today, 19(1): 95-102 (2014)に開示される。手短には、水性、全-H₂O溶媒が独特的の分光学的特性を有する水素の同位体で置き換えられる場合、この交換プロセスに従うことができる。最も最新のHDX実験には、重水素化又は「重」水(D₂O)が使用される。特に、骨格窒素に結合された水素(骨格アミド水素とも呼ばれる)は、タンパク質コンホメーションを調べるために有用である。例えば、Marcisin, et al. Anal Bioanal Chem. 397(3): 967-972 (2010)を参照のこと。タンパク質の露出した動的領域は、速く交換し、保護された柔軟性のない領域はより遅く交換する。全ての関連する状態(pH、温度、イオン強度など)は一定に維持されるので、構造の差異のみ(溶媒接近性、水素結合)がこの交換に影響を及ぼす。抗体とPAI-1との相互作用は、抗原の特定の部分の標識をブロックし、従って結合の部位(エピトープ)に基づく異なる読み出しを生じる。

【0421】

実験方法：

カニクイザル-PAI-1(10μM)、A44V11に結合したカニクイザル-PAI-1(それぞれ10μM)及びAPGv2に結合したカニクイザル-PAI-1(それぞれ10μM)をPBS中、pH7.2で準備した。タンパク質溶液を、1時間室温でインキュベートすることにより結合平衡に到達させた。<50pMのK_d値に基づいて、抗体:抗原複合体の各々は、以下に記載される標識条件下で>99%結合された。

【0422】

重水素交換、クエンチング、及びサンプル注入を、自動化ロボット工学システム(LEAP Tech., Carrboro, NC)により操作した。タンパク質溶液のアリコートを標識緩衝液(99.9%D₂O中PBS、pH7.2)で10倍に希釈し、そして20℃で10秒間、1分、5分、又は4時間インキュベートした。重水素交換時点の終わりに、等体積の予め冷却した(0℃)100mMリン酸ナトリウム、4Mグアニジン塩酸塩、0.5M TCEP、pH2.5に標識溶液50μLを加えることにより標識反応をクエンチした。非重水素化対照を同一のやり方でH₂O中PBSで10倍希釈することにより調製した。

【0423】

10

20

30

40

50

それぞれのクエンチされたサンプル(50 μ L、各タンパク質50pmol)を、HDX Technology (Waters Corp.、Milford、MA)を用いてWaters nanoAcuityに直ぐに注入した。タンパク質をオンラインで、20に保持した2.1mm × 30mm Enzymate BEHペプシンカラム(Waters Corp.)を用いて消化した。全てのクロマトグラフィー要素を、超高速液体クロマトグラフイー(UPLC)システムの冷却チャンバ内で0.0 ± 0.1に保持した。生じたペプチドを捕捉し、そして3分間100 μ L/分で脱塩し、次いで1.0 × 100.0 mm ACQUITY UPLC HSS T3カラム(Waters Corp.)で12分、2 ~ 40%アセトニトリル:水グラジエントを40 μ L/分で用いて分離した。重水素レベルは、逆交換について補正されず、そして相対的と報告された。全ての比較実験を同一の条件下で、逆交換補正の必要を否定して行った。全ての実験を三連で行った。注入の間のペプチドキャリーオーバーを、1.5Mグアニジン塩酸塩、0.8%ギ酸、及び4%アセトニトリル50 μ Lを各実行後カラム全体に注入することにより除去した。

【0424】

質量スペクトルを、標準エレクトロスプレー源(Waters Corp.)を備えHDMSeモードで操作されたWaters Synapt G2-Si機器を用いて得た。機器設定は以下のとおりであった: キャピラリーは3.5kVであり、サンプリングコーンは30Vであり、ソースオフセットは30Vであり、ソース温度は80であり、脱溶媒和温度は175であり、コーンガスは50L/時間、脱溶媒和ガスは600L/hであり、そしてネプライザーガスは6.5barであった。質量スペクトルを50 ~ 1700のm/z範囲にわたって得た。質量精度を、ロックマスプローブによる100fmol/uLヒト[Glu1]-フィブリノペプチドBの同時注入により各実行を通して維持した。

【0425】

非重水素化消化性ペプチドのMSE同定を、ProteinLynx Global Serverソフトウェア(Waters Corp.)を使用して行った。各ペプチドの重水素取り込みを、DynamX 2.0ソフトウェア(Waters Corp.)を使用して決定した。相対的重水素レベルを、非重水素化ペプチドの同位体分布の重心を、重水素標識ペプチドの対応する重心から差し引くことにより計算した。重水素取り込みプロットを、ソフトウェアにより自動的に生成した。

【0426】

PAI-1の状態についての重水素取り込みのモニタリング

オンラインペプシン消化の後、150の重複するカニクイザル-PAI-1消化性ペプチドを同定し、95.3%の配列包括度を生じた(図48を参照のこと)。重水素取り込みを、3つの異なるタンパク質の状態について全150ペプチドにおいてモニタリングした(10秒 ~ 4時間): (1) カニクイザル-PAI-1単独; (2) カニクイザル-PAI-1に結合したA44v11; 及び(3) カニクイザル-PAI-1に結合したAPGv2。

【0427】

カニクイザル-PAI-1ペプチドの大部分は、3つの状態の間でほとんど同一の重水素取り込みを示し、これはこれらの領域においてカニクイザル-PAI-1といずれかのmAbとの間に相互作用がないことを示す。図49(A)を参照のこと、これはこの結果を伴う1つの代表的なペプチド領域を示す(残基139 ~ 152)。対照的に、残基44 ~ 64を組み込んだペプチドは、A44v11又はAPGv2のいずれかに結合された場合に交換からの有意な保護(減少した重水素取り込み)を示した(図49(B))。さらに、残基295 ~ 322を組み込んだペプチドもまた、A44v11又はAPGv2のいずれかに結合された場合に交換からの有意な保護を示した(図49(C))。この領域について、保護の大きさは、カニクイザル-PAI-1がAPGv2よりもむしろA44v11に結合された場合により大きかった(図49(C)を参照のこと)。このことは、A44v11がカニクイザル-PAI-1に結合された場合にAPGv2よりも大きい交換からの全体の保護をもたらし得るということを示す。

【0428】

比較研究:

比較研究のために、重水素取り込みを、3つのカニクイザル-PAI-1の状態のそれから生成された150のペプチドの全てについてモニタリングした。(一般的には、Wei, et al.、Drug Discovery Today、19(1): 95-102 (2014)を参照のこと)。3つの状態のそれからのデータプロットを互いに比較し、そしてデータ解釈を容易にするためにバタフ

10

20

30

40

50

ライプロットを生成した(例えば図50(A)、51(A)、及び52(A)を参照のこと)。各バタフライプロットについて、x軸は、比較された150のペプチドのそれぞれの計算されたペプチド中点位置iであり;y軸は平均相対的部分交換(比)である。

【0429】

差異プロットも、カニクイザル-PAI-1の状態間の各比較について生成した(例えば、図50(B)、51(B)、及び52(B)を参照のこと)。これらのプロットにおいて、1つの状態からの重水素取り込みを、他のものから差し引いて、同様にバタフライプロットにプロットした。各ペプチドについての差異の合計を垂直のバーで表す。水平の破線は、個々の測定値($\pm 0.5\text{Da}$)又は差異の合計($\pm 1.1\text{Da}$)のいずれかが測定の誤差を超え、そして2つの状態の実際の差異とみなされ得る値を表す。この技術に関するさらなる詳細は、Houde D. et al 10 .. J. Pharm. Sci. 100(6):2071-86 (2011)に開示される。

【0430】

最初に、カニクイザル-PAI-1単独をA44v11:カニクイザル-PAI-1結合状態と比較した(図50)。この比較についてのバタフライプロットを図50(A)に示す。この比較についての差異プロットを図50(B)に示す。A44v11に結合されたカニクイザル-PAI-1と遊離形態カニクイザル-PAI-1との間の観察された差異は、カニクイザル-PAI-1の2つの領域に主に位置する。1つの領域はN末端に近く(残基44~64)そして他の領域はC末端に近い(残基307~321)(図50(B)を参照のこと)。

【0431】

次に、カニクイザル-PAI-1単独をAPGv2:カニクイザル-PAI-1結合状態と比較した(図51)。この比較についてのバタフライプロットを図51(A)に示す。この比較についての再プロットを図51(B)に示す。APGv2に結合されたカニクイザル-PAI-1と遊離形態カニクイザル-PAI-1との間の観察された差異は主にカニクイザル-PAI-1の2つの領域に位置している。1つの領域はN末端に近く、そして他方はC末端日欠く、これはA44v11:カニクイザル-PAI-1の結果と同様である。カニクイザル-PAI-1とのA44v11及びAPGv2複合体は、結合状態にある場合に減少した重水素取り込みを示すペプチドを共有し、これは2つの抗体のエピトープが類似していることを示し得る。

【0432】

最後に、2つの抗体結合カニクイザル-PAI-1抗体を互いに比較した(図52)。この比較についてのバタフライプロットを図52(A)に示す。この比較についての差異プロットを図52(B)に示す。A44v11:カニクイザル-PAI-1とAPGv2:カニクイザル-PAI-1との間の観察された差異はカニクイザル-PAI-1のC末端領域に位置する(図52(B)を参照のこと)。

【0433】

実施例25：抗体A44v11及びAPGv2のエピトープ比較

HDX MSを使用して、A44v11及びAPGv2抗体のエピトープをさらに規定した。HDX MSにおいて生成された重複ペプチドを使用することにより、抗体エピトープは、ペプチドレベルの解明よりも僅かに良好に精密化され得る(例えば、図48を参照のこと)。A44V11結合と結合して交換からの有意な保護を示したペプチドについてのHDX MSデータをさらに分析して、カニクイザル-PAI-1:A44v11相互作用についてのエピトープを決定した。カニクイザル-PAI-1のA44V11エピトープのHDXデータは、結晶学的アプローチを使用して決定されたエピトープと一致することが見出された。HDX MSを使用して同定されたカニクイザル-PAI-1のA44V11エピトープは図53に示され(太字)、そして以下に略記形式で示される:

T-T-G-G-E-T-R-Q-Q-I-Q (配列番号159);

R-H-L (配列番号160);

T-D-M-X-X-F-Q-A-D-F-T-S-L-S-N-Q-E-P-L-H-V (配列番号161)

【0434】

APGv2が結合して交換からの有意な保護を示したカニクイザル-PAI-1ペプチドについてのHDX MSデータを、カニクイザル-PAI-1:APGv2相互作用についてのエピトープをさらに決定するために分析した。A44v11及びAPGv2についてのHDX MSエピトープマッピングデータは、図52に一般的に見られるように、エピトープが同じ領域にあるということを示す。

10

20

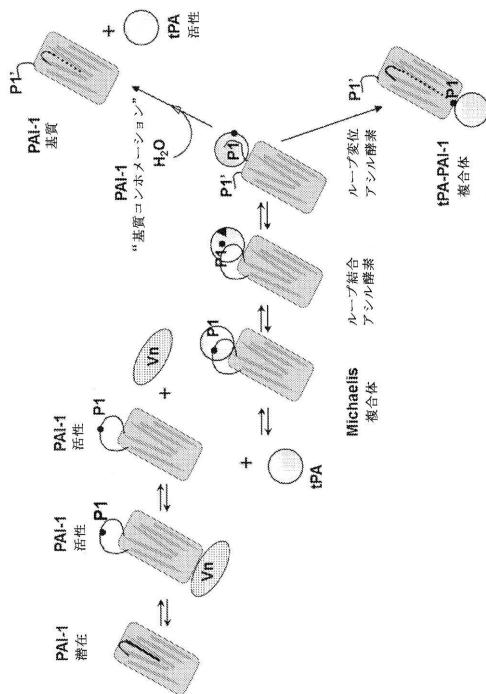
30

40

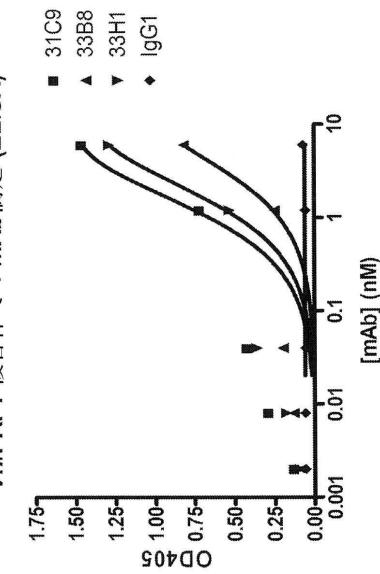
50

残基307～321の領域において、同じペプチドは、A44V11及びAPGv2の両方について抗体結合状態で保護を示す。しかし、保護の大きさは、カニクイザル-PAI-1がAPGv2よりもむしろA44V11に結合した場合により高い(図49(C)を参照のこと)。この知見は図52(B)においてより明らかであり、これはカニクイザル-PAI-1の残基307～321領域において差異ピークを示す。これは、カニクイザル-PAI-1とA44V11及びAPGv2抗体のそれぞれとの間の特異的接觸において差異があることを示す。従って、A44V11及びAPGv2の両方のエピトープはPAI-1の類似した領域に位置するが、各抗体についてのエピトープは同じではないようである。

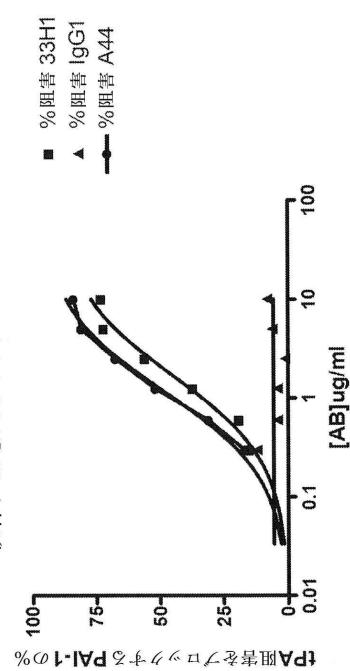
【図1】



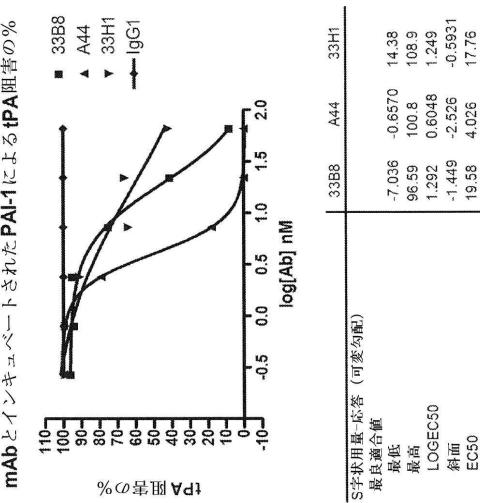
【図2】



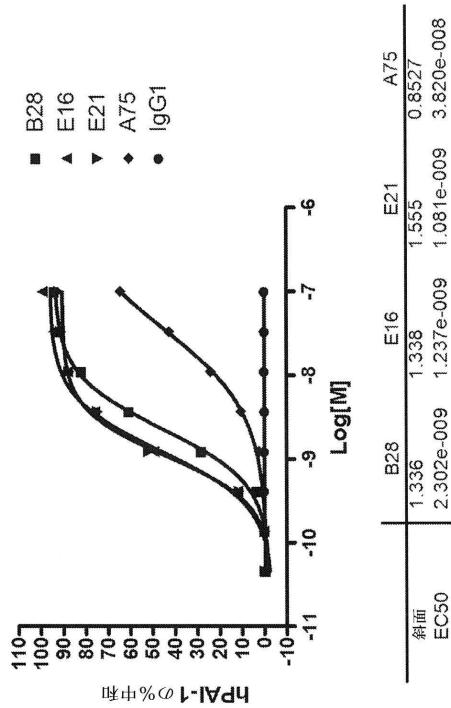
【図3】



【図4】

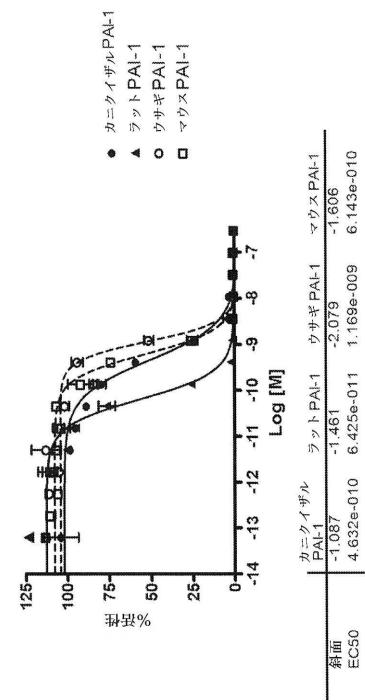


【図5】



【図6】

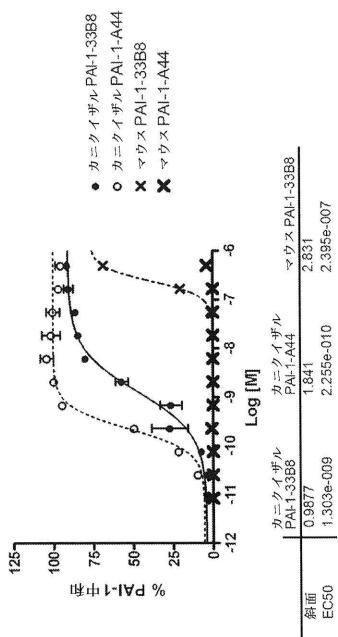
マウス、カニクリイザル、ラット、及びウサギ PAI-1
に対する **1.4 nM tPA %活性**



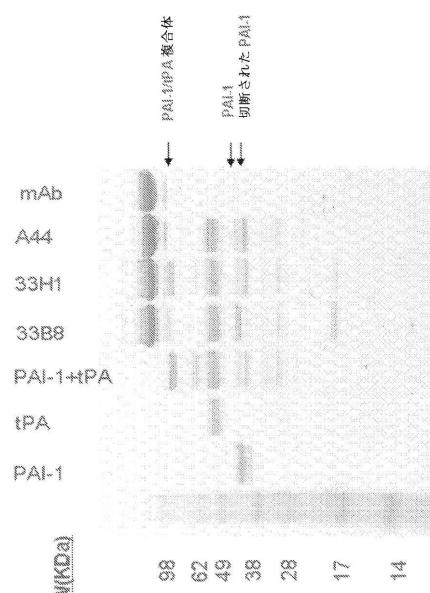
S抗体用濃度(%)	S抗体用濃度(%)			
	S抗体用濃度(%)			
最高	カニクリイザル PAI-1	ラット PAI-1	ウサギ PAI-1	マウス PAI-1
EC50	1.336	1.338	1.555	0.8527
最低	2.302e-009	1.237e-009	1.081e-009	3.820e-008

【図7】

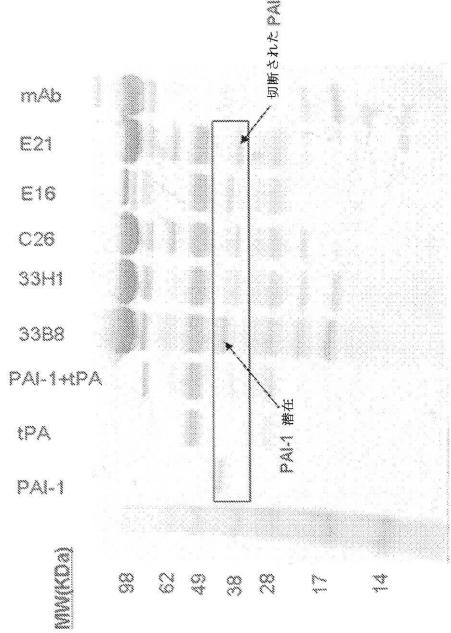
MabのIMA-33B8及びA44に対する2.8 nM カニクイザル及び
2.8 nMマウスPAI-1%中和



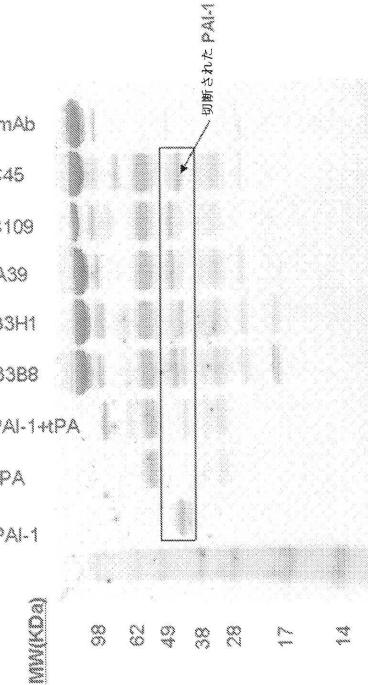
【図8】



【図9】



【図10】



【図11】

VL **整列**

A105: DVNTQPTPLSVTQGAPASICKSSQSLSDGKTYLNWILQPGOSPORLISVSK
 A39: DQNTHSAISLASSA5GEVVTICPASENITY---SYLAVYHQKQSPQQLIVNAKT
 A44: DQNTQPSMAYASGERVTICKASQDIN---SYLMSLQOQPGSPKPLITRANR
 A71: DVNTQPTPLSVTQGAPASICKSSQSLSDGKTYLNWILQPGOSPKLIVJYVK
 A75: DVNTQPTPLSVTQGAPASICKSSQSLSDGKTYLNWILQPGOSPKLIVJYVK
 B109: DVNTQSHKENSTSAGRVSTICKASQDVS---SAYVYQOKLGSSPKLILITASAE
 B28: DVNTQPSAISLASSA5GEVVTICPASENITY---SYLAVYQOKLGSSPKLILITASAE
 C45: DQNTQPSMAYASGERVTICKASQDIN---SYLMSLQOQPGSPKPLITRANR
 E16: DVNTQSHKENSTSAGRVSTICKASQDVS---TAVGNYQOBPGSPKPLILITASAE
 E21: DQNTQPSLSSAISLASSA5GEVVTICPASENITY---SYLAVYQOKLPDKVLLITYTSR

vlambda3とA44 LCの整列：

A44: DQNTQPSMAYASGERVTICKASQDIN SYLMSLQOQPGSPKPLILYR
 VL3: -SYELTQPPS VSYSPGQAS ITXSGDKLG KYASWYQKQ GQSPVLYQ
 A44: ANRSVDGVPS RFSGSGQD YSLTISLLEY EDMGJYYLQ YDEFPTFGG
 VL3: DSKPGSipe RFSGNSNGT ATLTSGQA MDEAYYXQA WDSSAVVFGG
 A44: GTKLEIK
 VL3: GTKLEIK
 A44: GTKLEIK
 VL3: GTKLEIK

【図13】

【図12】

VH **整列**

A105: LDGCVPDRFTSGSGTDFTLKLSRYEGADLGYYCQDRHPRFPRFEGGTKEIKRAD
 A39: LAEGVPSRFSGSGTQFSLNLSLGEDPETYCQBRYESPWTFFGGTKEIKRAD
 A44: SYDQVPSRFSGSGTDFSLTSSLEYEDMGITYCQDDEPFFPGGTKEIKRAD
 A71: LDGCVPDRFTSGSGTDFTLKLSRYEAEDLGYYCQDWTDEPRFEGGTKEIKRAD
 A75: LDGCVPDRFTSGSGTDFTLKLSRYEGADLGYYCQDWTDEPRFEGGTKEIKRAD
 B109: RYTGVPDRFTSGSGTDFTLTSSLEYEDLGYYCQHSSPFTFGGTKEIKRAD
 B28: LAEVVPSRFSGSGTQFLKINLYQEDFGSTYQHSSPFTFGGTKEIKRAD
 C45: IVDEGVPSRFSGSGQDYSITLSSLEYEDMGITYCQDDEPRFEGGTKEIK---
 E16: RHTGVPSRFSGSGTDFTLTSSLEYEDLGYYCQHSSPFTFGGTKEIK---
 E21: IHSVAVPSRFSGSGTDXSLTSLNQEIDATEFGQGNLPLNFTFGGTKEIK---

【図14】

vh2とA44 HCの整列：

A44: EMQLOESGPS LVKPSQTLSL TCSVIGDSMT -NGWNWIR KEPGNKLEM
 VH2: QVTLKESGPT LVKPSQTLTL TCTFGESELIS TSGVGYGWIR QPGEAELWL
 A44: GYTTSGSTY YNPSLKRGRIS ITNTSKNQY YLQISVYUTE DTATYCARW
 VH2: ARIIDDDKY YSTSKTRL ISKDTSKNQV VLTNMNDPV DTATYCARW
 A44: HYGSYYFDY WQGQTLTVSS
 VH2: GFTG-TYFDY WQGQTLTVSS

vh4とA44 HCの整列：

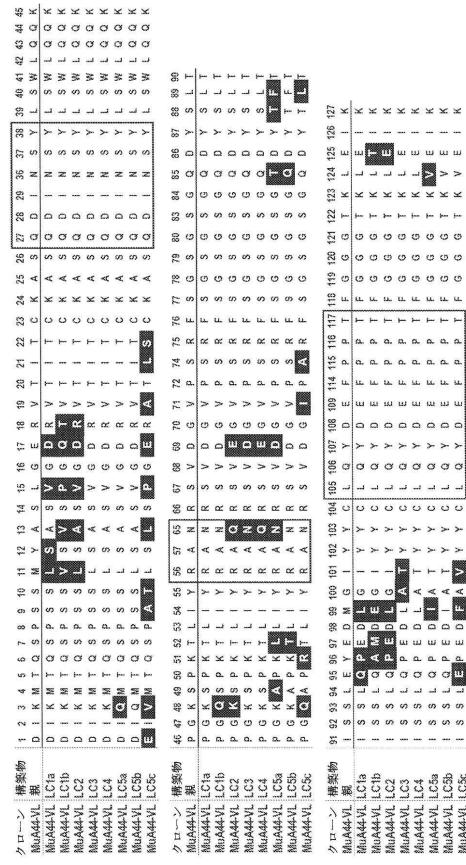
A44: EMQLOESGPS LVKPSQTLSL TCSVIGDSMT NGYWNWIRKF PGNKLEYNGY
 VH4: QVQLOESGPS LVKPSQTLSL TCSVIGDSMT SYEWSWIRQ PGKGLEWIGY
 A44: ITYSGTYN ESLKRSIT RNTSKNQYL QLSSVYTEDT ATYYXAWHY
 VH4: IYYSGTYN ESLKRSIT VDTSKNQFSL KLSSTAAAT AVYXARGDS
 A44: GSPYFEDWQ GCTLIVVSS
 VH4: SG-YYFEDWQ GCTLIVVSS

VH **整列**

A105: QVQLOSGAELMRPGASVKSCKTGFSTLYWIEVKORPGL---GLEWIGELPESGST
 A39: QVQLOSGAELMRPGASVKSCKTGFSTLYWIEVKORPGL---GLEWIGELPESGST
 A44: EMQLOESGPS LVKPSQTLSL TCSVIGDSMT SYTVMWIRPEN---KLYENGYT-YSSST
 A71: QVQLOSGAELMRPGASVKSCKTGFSTLYWIEVKORPGL---GLEWIGELPESGST
 A75: QVQLOSGAELMRPGASVKSCKTGFSTLYWIEVKORPGL---GLEWIGELPESGST
 B109: EYQKQSGSVAELRQGIVSVMOKSGPSFSYVSKWIKORPGL---GLEWIGELPESGST
 B28: QVQLOSGAELMRPGASVKSCKTGFSTLYWIEVKORPGL---GLEWIGELPESGST
 C45: QVQLOSGAELRQGIVSVMOKSGPSFSYVSKWIKORPGL---GLEWIGELPESGST
 E16: EYQKQSGSVAELRQGIVSVMOKSGPSFSYVSKWIKORPGL---GLEWIGELPESGST
 E21: EYQKQSGSVAELRQGIVSVMOKSGPSFSYVSKWIKORPGL---GLEWIGELPESGST

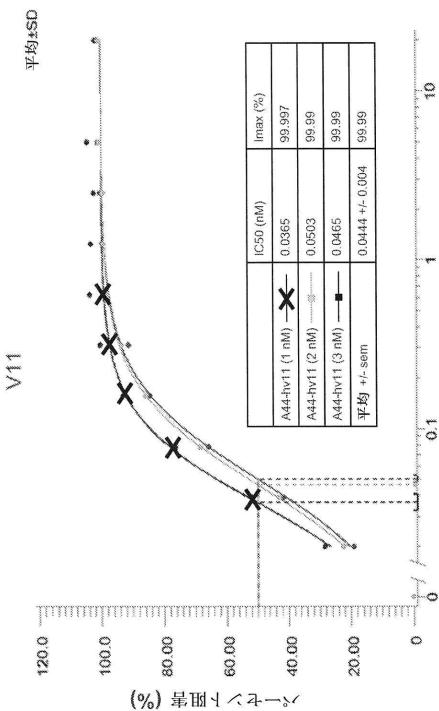
A105: NYEKPKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 A39: NYEKPKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 A44: YIPSKKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 A71: NYEKPKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 A75: NYEKPKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 B109: TYQKQSGAELRQGIVSVMOKSGPSFSYVSKWIKORPGL---GLEWIGELPESGST
 B28: NYEKPKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 C45: NYEKPKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 E16: YDPSKKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP
 E21: EYDPSKKGKATFTADTSNTAMQSLSSTEDAVYCARL---GLYLDWGGTLLVSSAKTTP

【図15】

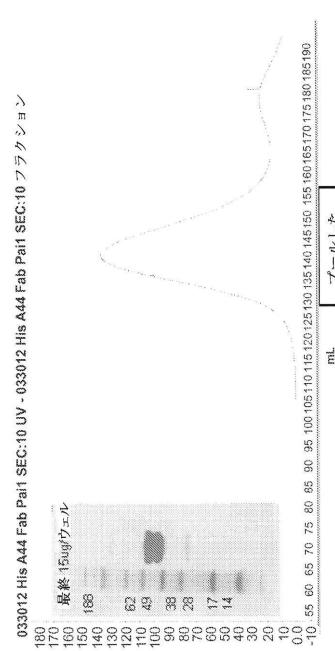


【図16】

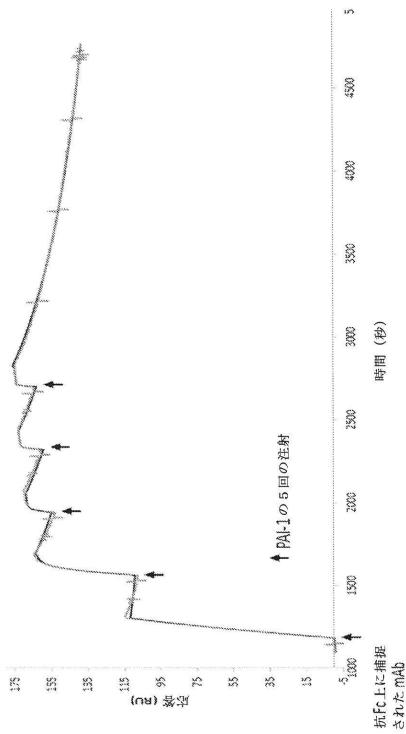
【 図 1 7 】



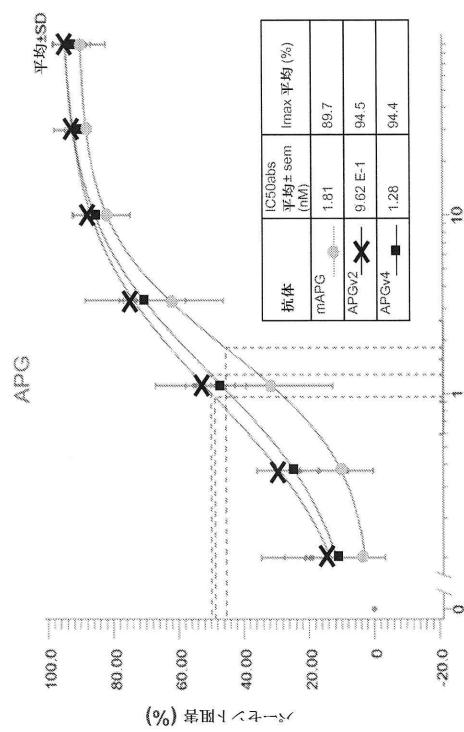
【図18】



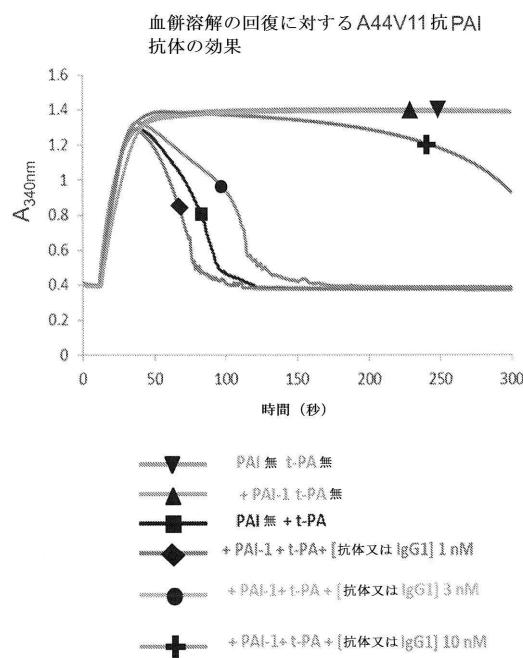
【図19】



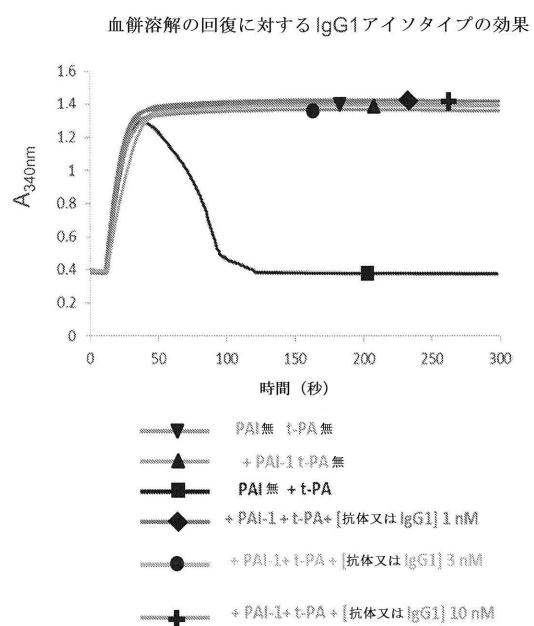
【図20】



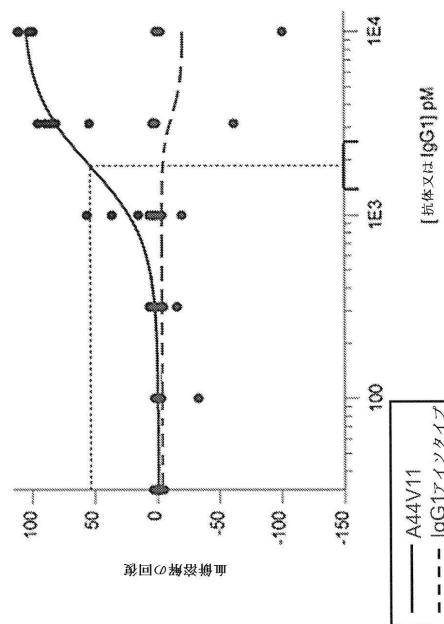
【図21】



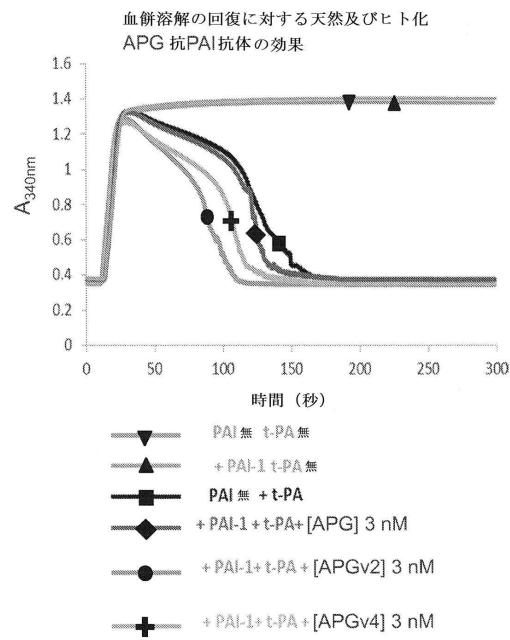
【図22】



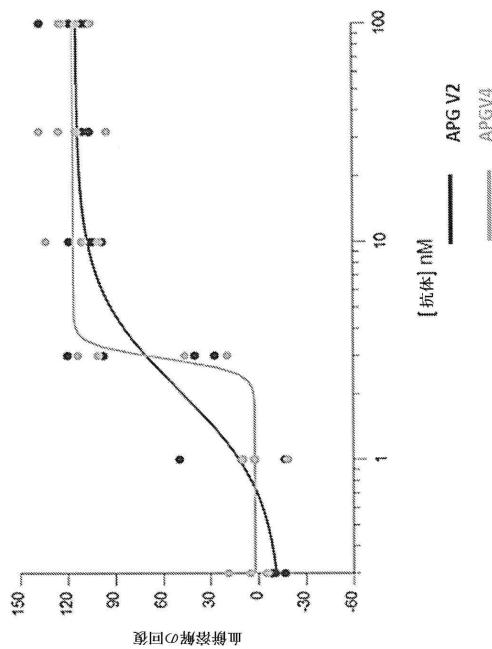
【図23】



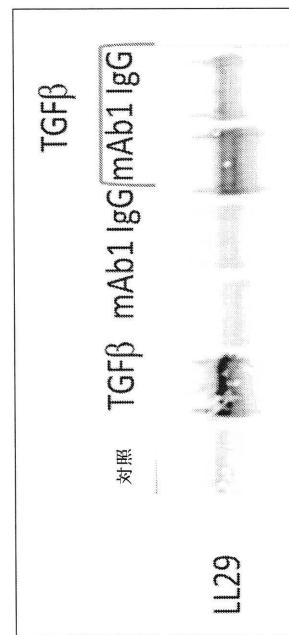
【図24】



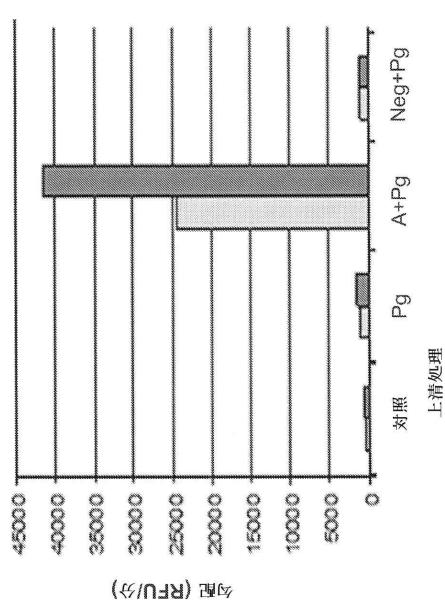
【図25】



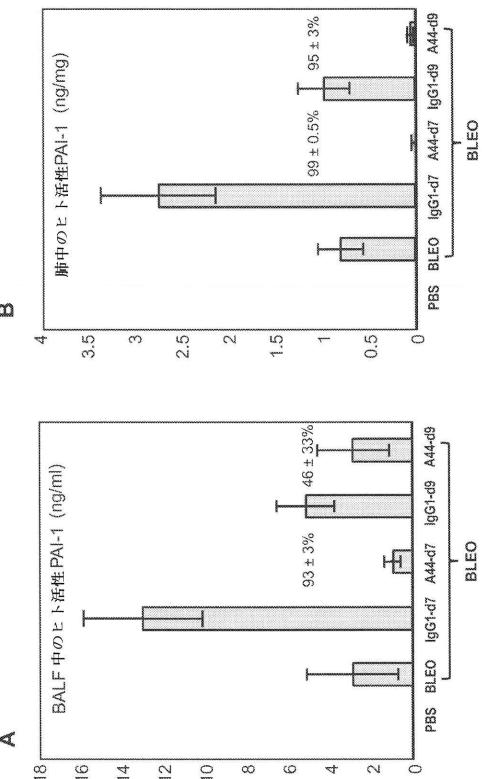
【図26】



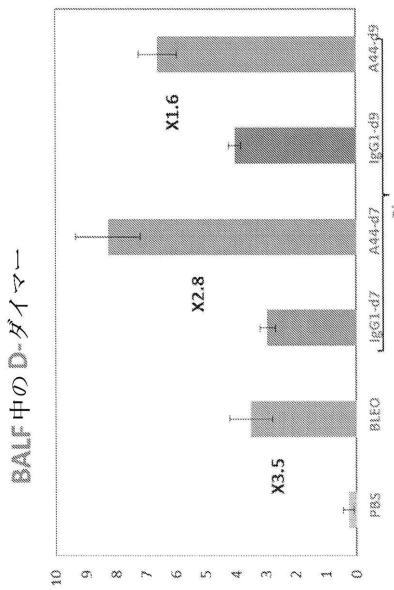
【図27】



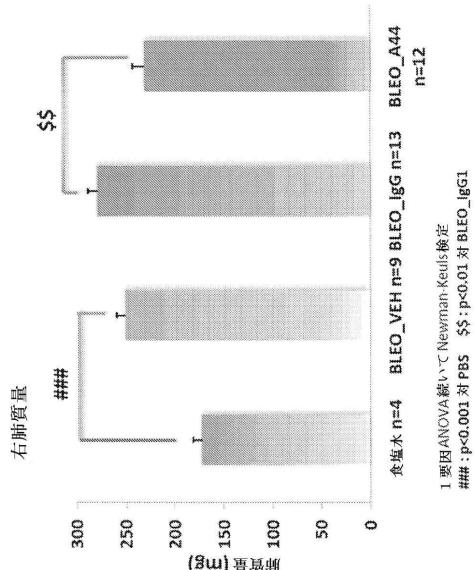
【図28】



【図29】



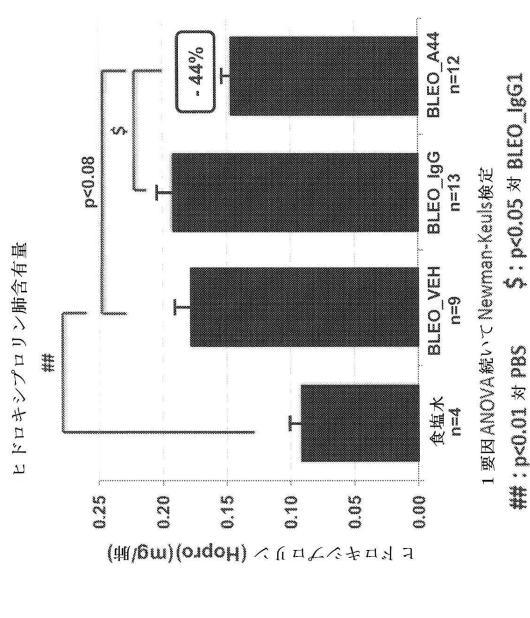
【図30】



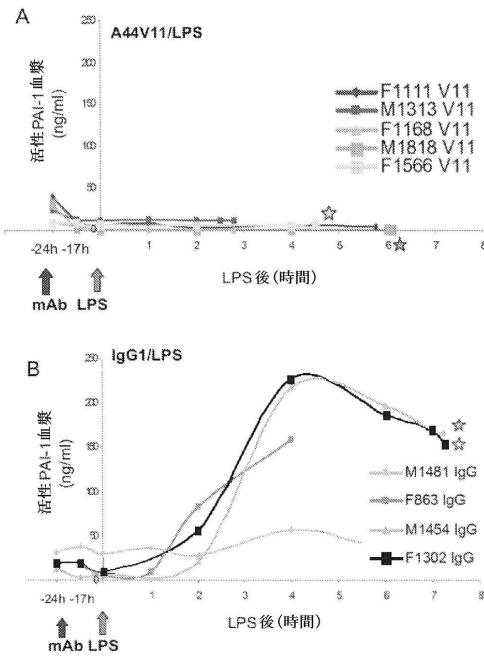
1要因ANOVA統計学的検定
###: p<0.001 対 PBS
##: p<0.01 対 PBS

###: p<0.001 対 PBS
##: p<0.01 対 PBS

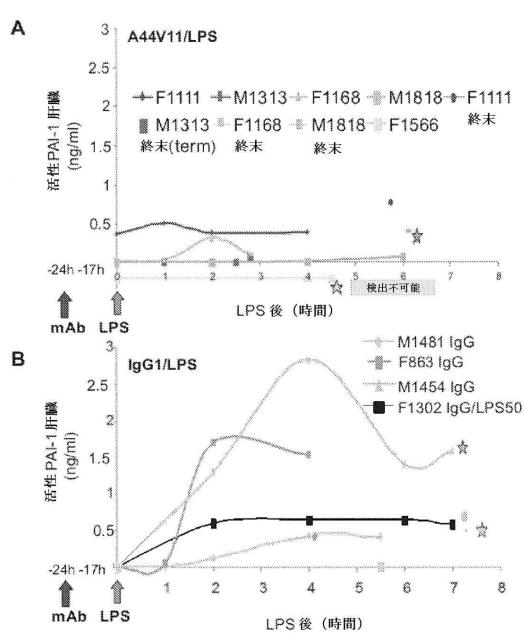
【図31】



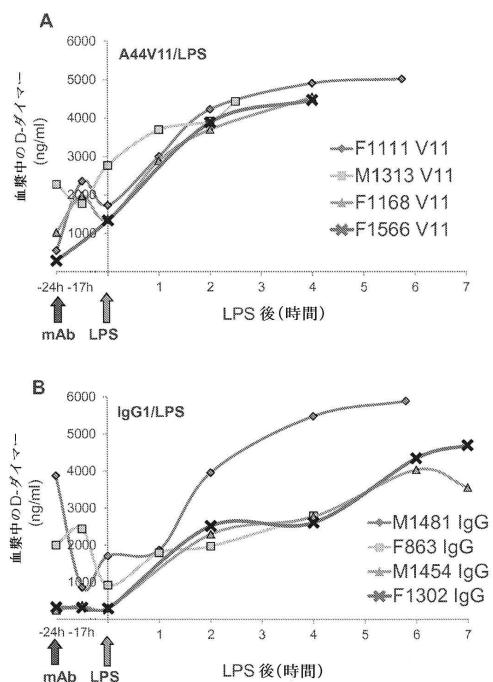
【図32】



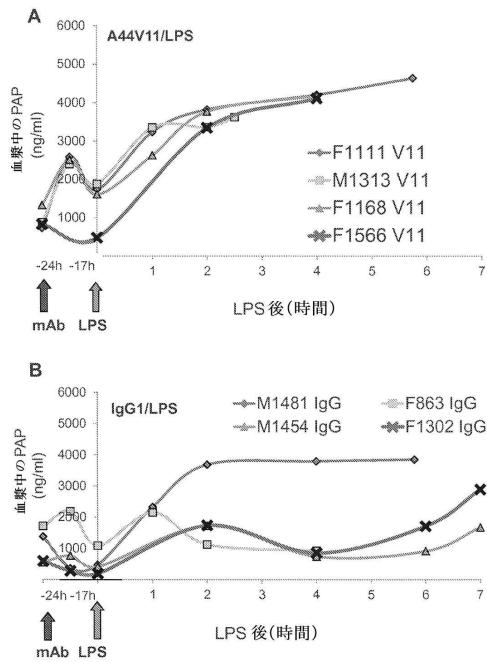
【図33】



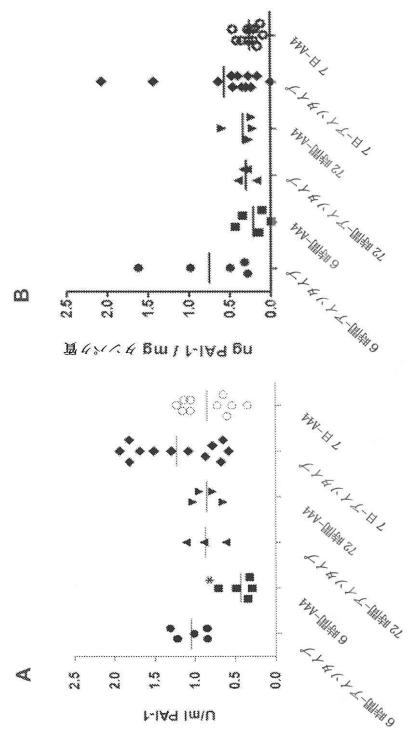
【図34】



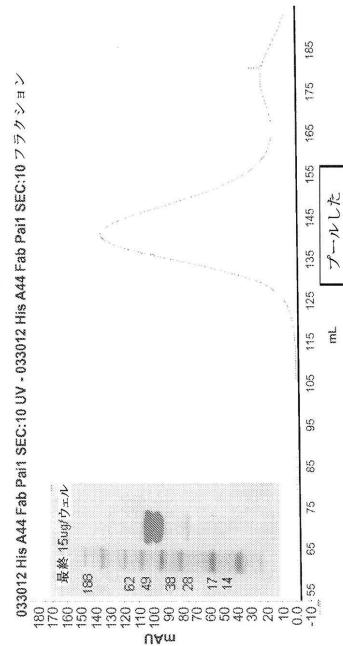
【図35】



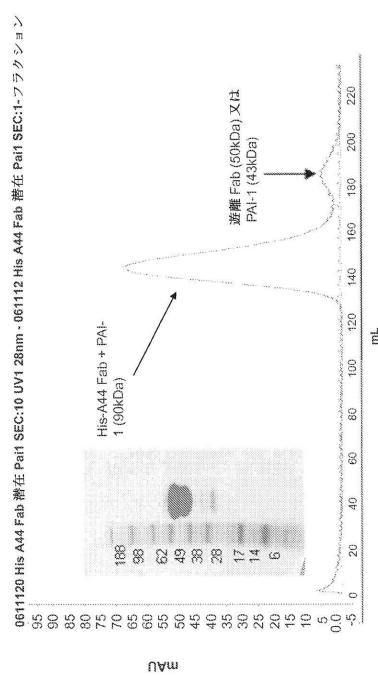
【図36】



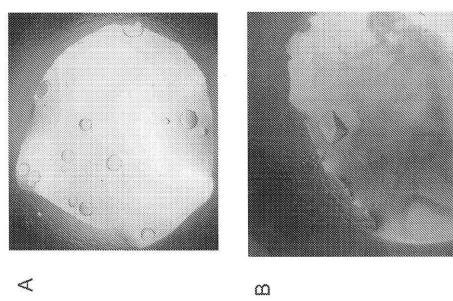
【図37】



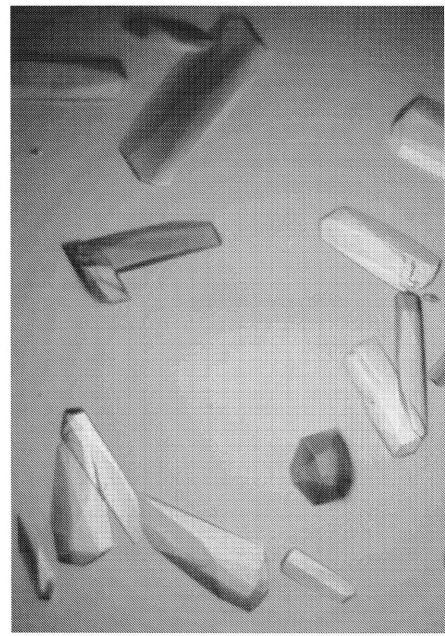
【図38】



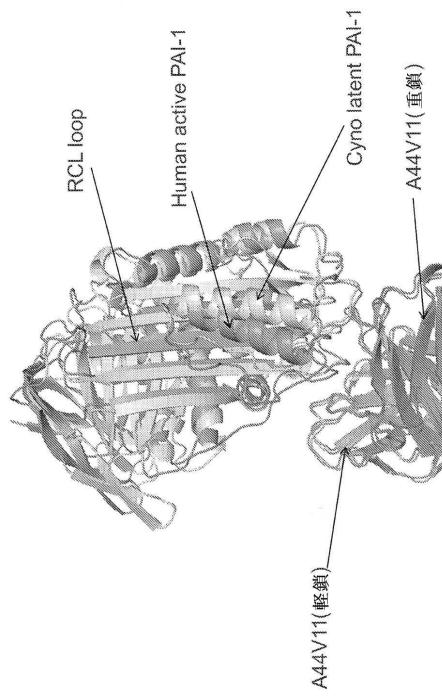
【図39】



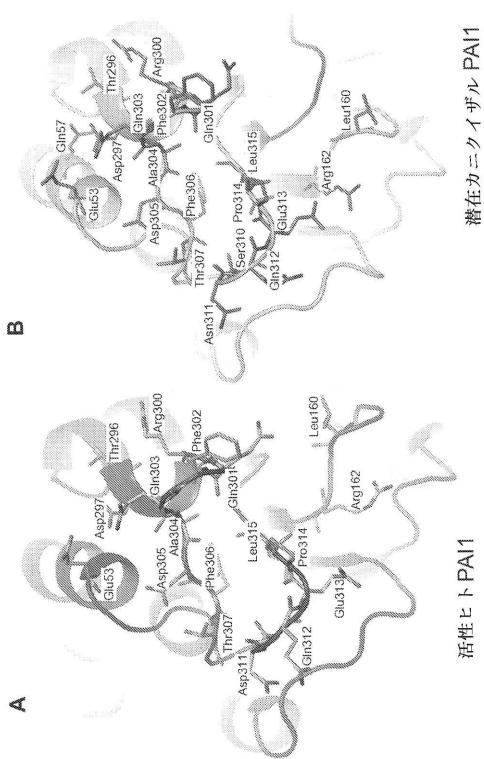
【図40】



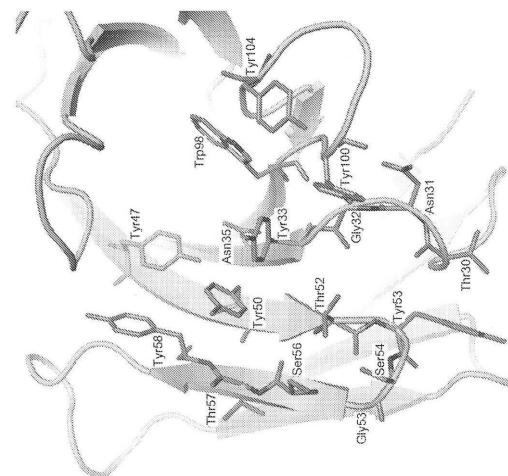
【図41】



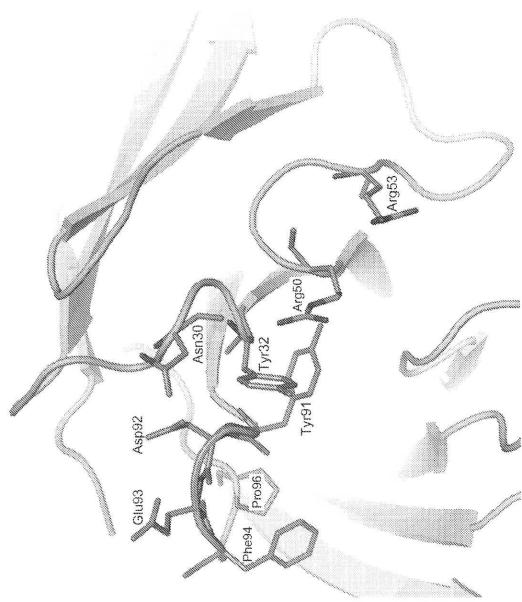
【図42】



【図43】



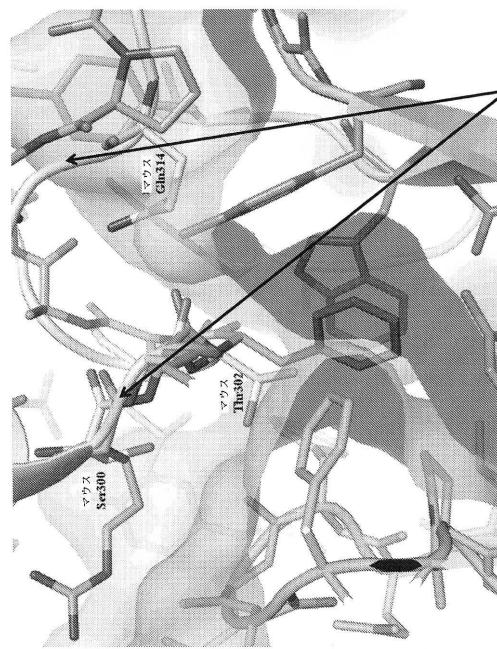
【図44】



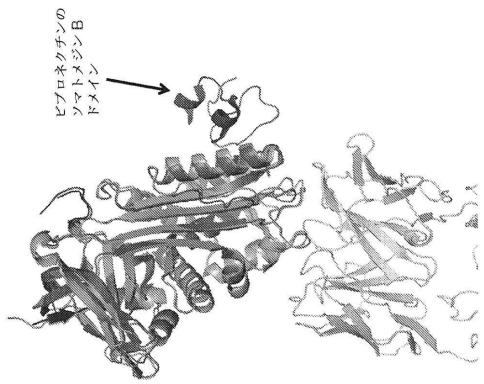
【図45】

PAI-1 ハニクイザル	TTGGCTTGTQ1Q
PAI-1 ヒト	TTGGCTTGTQ1Q
PAI-1 ラット	TTACKTTRQ1Q
PAI-1 マウス(Sousris)	TTACKTTRQ1Q
PAI-1 ハニクイザル	GAVDQLTRIVLVNA
PAI-1 ヒト	GAVDQLTRIVLVNA
PAI-1 ラット	GAVNLTRIVLVNA
PAI-1 マウス	GAVDELTRIVLVNA
PAI-1 ハニクイザル	PLENLGMDTQFQADFTSLSNQEDLIVVQAQLQKVIE
PAI-1 ヒト	PLENLGMDTQFQADFTSLSNQEDLIVVQAQLQKVIE
PAI-1 ラット	PLEKLGMTDIFSTQADFTSLSDQEQLSVAQALQKVIE
PAI-1 マウス	PLEKLGMTPDMSATLADFTSLSDQEQLSVAQALQKVIE

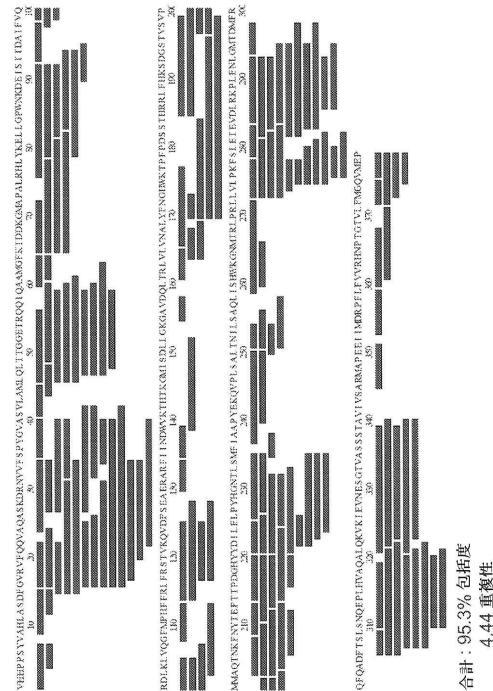
【図46】



【図47】

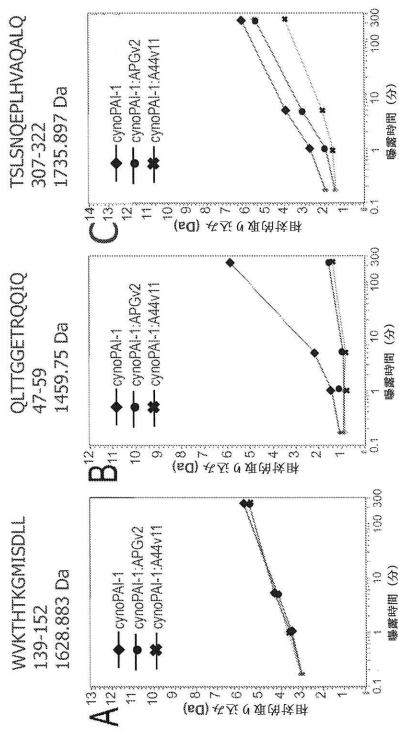


【図48】

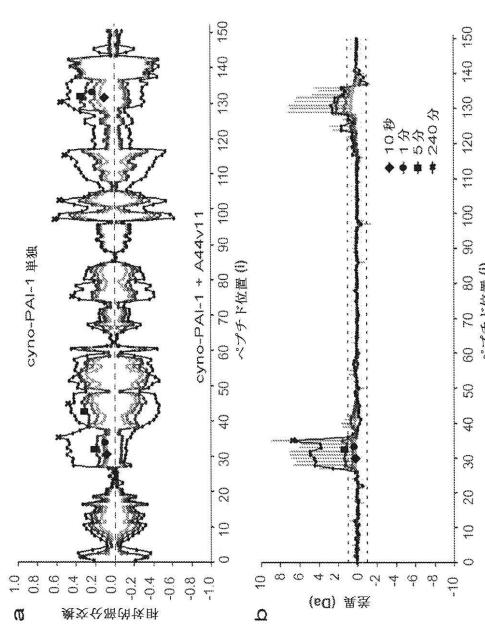


合計: 95.3% 包括度
4.44 重複性

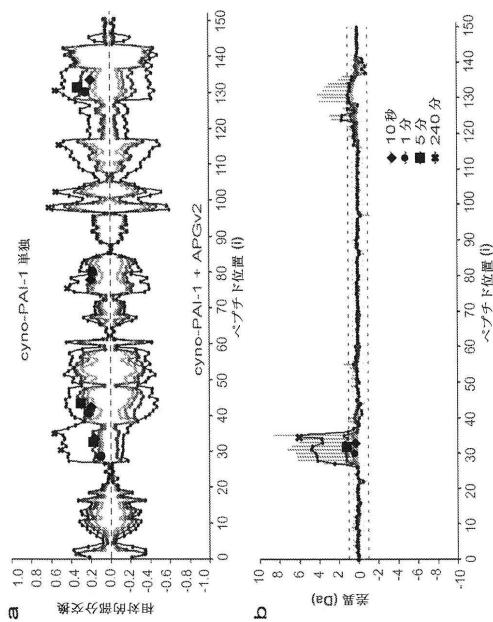
【図49】



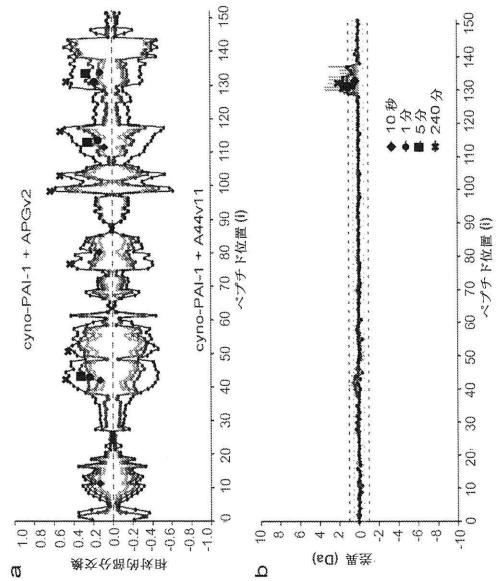
【図50】



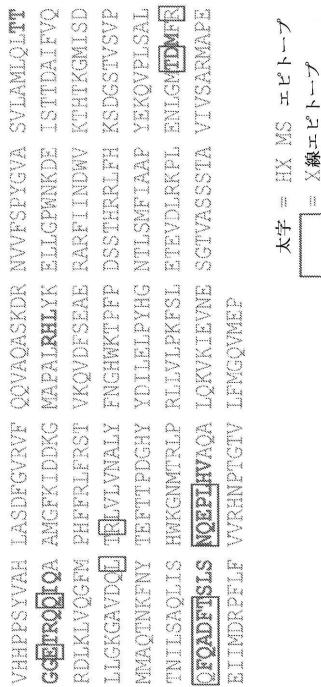
【図 5 1】



【図 5 2】



【図 5 3】



【配列表】

0006696899000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	15/06	(2006.01)	C 1 2 N	15/06 100
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13

(72)発明者 アラ・プリツツカー

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807. ブリッジウォーター. コーポレートドライブ55
. メールコード: 55エー-505エー. サノフィ

(72)発明者 パトリック・グライエ

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

(72)発明者 アレクセイ・ラク

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

(72)発明者 マガリ・マチュー

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

(72)発明者 クリストファー・ライアン・モーガン

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807. ブリッジウォーター. コーポレートドライブ55
. メールコード: 55エー-505エー. サノフィ

(72)発明者 ニコラ・ボラン

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

(72)発明者 ブリュノ・ポワリ

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

(72)発明者 シリル・デイブ

フランス国エフ-75007パリ. リュ・デュポン・デ・ロッジュ5

(72)発明者 フランシス・ドウフィユー

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

(72)発明者 ハン・リー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19067. ヤードリー. ツイッグルーン388

(72)発明者 ドロシア・コミノス

アメリカ合衆国ニュージャージー州07946. ミリントン. ローリングヒルドライブ99

(72)発明者 フィリップ・ジャニヤク

フランス国エフ-75008パリ. リュ・ラ・ボエティ54. サノフィ

審査官 小林 薫

(56)参考文献 国際公開第2011/139973 (WO, A2)

米国特許出願公開第2009/0136500 (US, A1)

特開平10-014592 (JP, A)

特開平02-291263 (JP, A)

Biochim. Biophys. Acta, 1997, Vol.1337, p.257-266

J. Thromb. Haemost., 2003, Vol.2, p.298-305

Brit. J. Pharmacol., 1998, Vol.125, p.29-34

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C12N 15/00 - 15/90
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)
DWPI (Derwent Innovation)