

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 915**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	C12P 21/08	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
A61P 7/02	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)		
A61P 41/00	(2006.01)		
C07K 16/38	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/JP2015/054704**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15125904**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15751458 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3109320**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-PAI-1 humano**

30 Prioridad:

21.02.2014 JP 2014031319

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

10.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TANAKA, HIROTSUGU y
YOSHINO, MASAYASU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 726 915 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo anticuerpo anti-PAI-1 humano

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un novedoso anticuerpo anti-PAI-1 humano.

Antecedentes de la técnica

10

El inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) es uno de los inhibidores de la serina proteasa producida a partir del endotelio vascular o similar. PAI-1 se une a un activador del plasminógeno (PA), que es una serina proteasa, para inactivar una actividad enzimática de PA (Mol. Cell. Endocrinol., 1990, Vol. 68, pág. 1-19). Con respecto a PAI-1, hay PAI-1 activo, PAI-1 latente y PAI-1 unido y que forma complejo con PA y la propiedad de PAI-1 de inhibir PA se posee solo por PAI-1 activo (Blood, 1987, Vol. 70, pág. 1090-1098). Existen dos tipos de PA: 15 activador del plasminógeno tisular (tPA) y activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA, también denominado urocinasa), ambos los cuales activan el plasminógeno para convertirlo en plasmina, catalizando, de este modo, una reacción que somete a lisis fibrina producida durante la coagulación sanguínea (en lo sucesivo en el presente documento denominado como un sistema fibrinolítico). PAI-1 activo se une a tPA y uPA para formar un complejo. 20 Las propiedades biológicas que desactivan PA se han elucidado completamente y la unión de PAI-1 activo a PA da como resultado la inhibición de un sistema fibrinolítico para facilitar, de este modo, la formación de trombos.

25

La característica de la estructura estérica de PAI-1 activo es que el bucle del centro activo que es un sitio de unión a PA se extiende y expone al exterior de la proteína (J. Biol. Chem., 2001, Vol. 276, pág. 44912-44918). En sangre en circulación, el PAI-1 activo puede unirse a su cofactor vitronectina para formar un complejo (J. Biol. Chem., 1988, Vol. 263, pág. 15454-15461). La vitronectina inhibe el cambio conformacional de una forma activa de PAI-1 en una forma latente del mismo (J. Biol. Chem., 1990, Vol. 265, pág. 18490-18498). El PAI-1 latente tiene una estructura estérica estable donde el bucle del centro activo está doblado hacia dentro. Una vez PAI-1 se convierte en una forma latente, se vuelve incapaz de unirse a PA (J. Biol. Chem., 2008, Vol. 283, pág. 18147-18157. *Nature*, 1992, Vol. 355, pág. 270-273). Por otra parte, puesto que PAI-1 que forma complejo con tPA o uPA está cada uno unido a tPA o uPA, este PAI-1 no puede unirse nuevamente a otra PA. Es decir, con respecto a PAI-1 activo, existe PAI-1 activo que está presente como un monómero y PAI-1 activo que está presente como un complejo con vitronectina y estas formas activas de PAI-1 tienen una función para inactivar PA mediante su unión a PA.

35

Un aumento en PAI-1 activo en el plasma se ha sugerido por estar implicado en fibrosis tisular y formación de trombos mediante la inhibición de PA y se cree, por consiguiente, que está implicado en enfermedades, tales como fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, nefropatía diabética, nefritis por lupus, enfermedad del injerto contra el huésped, glomerulonefritis, síndrome nefrótico, fibrosis renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión renal aguda, lesión pulmonar aguda, insuficiencia respiratoria aguda, degeneración macular asociada a la edad, coagulación intravascular diseminada, adherencia postquirúrgica, adherencia vitreomacular sintomática, retinopatía diabética, arteriosclerosis, infarto de miocardio, infarto cerebral, infarto pulmonar, enfermedad acompañante de fibrosis ocular tal como cicatrización de la conjuntiva después de cirugía de glaucoma, esclerosis peritoneal y similares.

40

45

En asociación con la fibrosis pulmonar, se ha dado a conocer que la expresión y secreción de PAI-1 se ve aumentada en fibroblastos derivados de biopsia pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (J. Biol. Chem., 2010, Vol. 285, N.º 11, pág. 8196-8206). Además, se ha confirmado en ensayos que usan ratones modelo patológicos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina que la fibrosis del pulmón se inhibe en ratones con una deficiencia genética de PAI-1 (J. Clin. Invest., 1996, Vol. 97, N.º 1, pág. 232-237). Por otra parte, también se ha confirmado que la fibrosis pulmonar se inhibe mediante la inhibición de PAI-1, en los casos en los que un inhibidor PAI-1 de bajo peso molecular y ARNs de PAI-1 se administraron a los modelos de ratón patológicos anteriormente mencionados (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2008, Vol. 28, pág. 672-677. *Thorax*, 2010, Vol. 65, pág. 334-340).

50

55

Por lo tanto, el desarrollo de un anticuerpo monoclonal que tiene una actividad capaz de inhibir la acción mediante PAI-1 activo mediante unión específica a PAI-1 activo se espera que sea útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades en las que PAI-1 está implicado en la patogénesis de las mismas.

60

Como anticuerpos que muestran una acción inhibidora funcional sobre PAI-1 humano activo, se han dado a conocer anticuerpos monoclonales de ratón MA-33B8 (Documento de patente 1), MA-33H1F7 (Documento no de patente 1), MA-55F4C12 (Documento no de patente 1) y MA-56A7C10 (Documento de patente 2) y un anticuerpo CT140 humanizado de MA-33B8 (Documento de patente 1) y un anticuerpo completamente humano MEDI-579 (también denominado CAT-1001 o PICK167_A01-fgl IgG1, Documento de patente 3) que se preparó usando un fago. Entre los mismos, MA-56A7C10 y MEDI-579 muestran aproximadamente 4,0 veces y aproximadamente 20 veces de actividad de unión superior, respectivamente, para PAI-1 humano activo que para PAI-1 humano que tiene una estructura estérica distinta de la forma activa (Documentos de patente 2 y 3). Además, MEDI-579 también muestra un efecto inhibidor sobre PAI-1 de ratón y se espera, por lo tanto, que tenga un efecto medicinal sobre nefritis lúpica, 65

esclerodermia, nefropatía diabética y trombosis basándose en los resultados mediante el uso de ratones modelo patológicos de esas enfermedades (Documento de patente 3).

5 En el caso de uso de un anticuerpo anti-PAI-1 humano como un fármaco de anticuerpo, los principales factores que definen una dosis eficaz del anticuerpo pueden incluir una actividad inhibidora del anticuerpo en la unión de PAI-1 activo y PA, selectividad del anticuerpo para PAI-1 activo y cantidades de PAI-1 y PAI-1 activas de otras estructuras estéricas presentes en el cuerpo. Como se usan en el presente documento, la expresión "PAI-1 de otras estructuras estéricas" se refiere a PAI-1 latente y PAI-1 que forman complejo con tPA o uPA.

10 Más del 90 % del PAI-1 total en plasma humano se almacena en plaquetas. Aproximadamente dos tercios del PAI-1 total es una forma activa en el plasma excepto para las plaquetas (Br. J. Haematol., 1988, Vol. 70, pág. 327-333. Blood, 1988, Vol. 71, pág. 220-225). La actividad de PAI-1 en el plasma (actividad de PAI-1 activo expresado en términos de capacidad de unión a tPA) así como cantidades de PAI-1 total en el plasma (cantidades totales de PAI-1 detectadas por un anticuerpo anti-PAI-1 que detecta todo el PAI-1) y cantidades de un complejo de PAI-1 y tPA en el
15 plasma (cantidades de un complejo que se detecta como una combinación de un anticuerpo anti-PAI-1 y un anticuerpo anti-tPA) aumentan en diversas patologías humanas (Thromb. Res., 2008, Vol. 122, pág. 466-472. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000, Vol. 20, pág. 2019-2023. Nat. Med., 1996, Vol. 2, pág. 800-803). También en el plasma excepto en las plaquetas, el complejo de tPA-PAI-1 está presente como aproximadamente un tercio de la cantidad de PAI-1 activo (Blood, 1990, Vol. 76, pág. 930-937). Los complejos de uPA y uPA-PAI-1 así como tPA
20 están presentes en tejidos. En conclusión, PAI-1 distinto de PAI-1 activo está presente en el organismo humano en una proporción que no se puede ignorar en términos de cantidad de PAI-1 total.

25 El documento EP 0320840 desvela péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos del sitio activo del inhibidor del activador del plasminógeno endotelial, un proceso para su preparación, anticuerpos que se generan inmunizando animales con esos péptidos así como el uso de estos anticuerpos para bloquear el inhibidor del activador del plasminógeno en sangre humana.

Técnica anterior

30 **Documento de patente**

[Documento de Patente 1] US 2010/0254979
[Documento de Patente 2] WO 2002/034776
[Documento de Patente 3] WO 2011/139973

35 **Documento no de patente**

[Documento de no Patente 1] The Journal of Biological Chemistry (US) 2000, Vol.275, pág. 6375-6380

40 **Divulgación de la invención**

Problemas que deben resolverse por la invención

45 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-PAI-1 humano para prevenir o tratar fibrosis pulmonar mediante la inhibición más selectiva de PAI-1 humano activo en comparación con un anticuerpo anti-PAI-1 humano convencional.

Medios para resolver los problemas

50 Los presentes inventores han llevado a cabo de forma exhaustiva y repetida estudios inventivos sobre la preparación de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que tiene alta selectividad de PAI-1 humano activo. Como consecuencia, los presentes inventores han preparado un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de números 1 a 108 de la SEQ ID NO: 4 (Ejemplos 1
55 a 3) y han encontrado que este anticuerpo anti-PAI-1 humano inhibe PAI-1 humano activo en el plasma (Ejemplo 5) y tiene una alta selectividad para PAI-1 humano activo que forma complejo con vitronectina (Ejemplo 6). Se ha proporcionado el anticuerpo anti-PAI-1 humano anteriormente mencionado y se ha completado la presente invención basándose en estos resultados.

60 La presente invención incluye la siguiente invención como un material o un método que es médica o industrialmente aplicable.

1. Un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

65 una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 31 a 35 de la SEQ ID NO: 2, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos

de aminoácidos números 50 a 66 de la SEQ ID NO: 2 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 99 a 107 de la SEQ ID: 2; y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 24 a 34 de la SEQ ID NO: 4, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 50 a 56 de la SEQ ID NO: 4 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 89 a 97 de la SEQ ID: 4.

2. El anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el artículo 1, que se selecciona de cualquiera uno de los siguientes (1) y (2):

(1) un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID: 4; y

(2) un anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo, en el cual el ácido glutámico en el extremo N de la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo se modifica a ácido piroglutámico.

3. El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el artículo 2, que se selecciona de cualquiera uno de los siguientes (1) y (2):

(1) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; y

(2) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la cual el ácido glutámico del aminoácido número 1 se modifica a ácido piroglutámico y/o la lisina del aminoácido número 448 se elimina en SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

4. El anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 3, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

5. El anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 3, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

6. Un polinucleótido, que se selecciona de cualquiera uno de los siguientes (1) y (2):

(1) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y

(2) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el artículo 2.

7. Un polinucleótido, que se selecciona de cualquiera uno de los siguientes (1) y (2):

(1) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y

(2) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4.

8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2.

9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4.

10. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión que se describe en el artículo 8, que se selecciona entre el grupo que consiste en el siguiente (a) a (b):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el

fragmento de unión a antígeno del mismo; y

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

11. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión que se describe en el artículo 8, que se selecciona entre el grupo que consiste en el siguiente (a) a (b):

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo; y

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

12. Un método de producción de un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en el siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en el artículo 2 y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

13. Un método de producción de un anticuerpo anti-PAI-1 humano, que comprende cultivar célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en el siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano:

(a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo; y

(c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano que se describe en el artículo 4 y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano.

14. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y:

(1) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; y/o

(2) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

El anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión de antígeno del mismo incluye una fusión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo con otro péptido o proteína y una modificación que tiene un agente modificador unido al mismo.

5 **Efectos de la invención**

El anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención puede usarse como un agente para prevenir o tratar una enfermedad en la que el PAI-1 humano activo está implicado en la patogénesis de la misma, por ejemplo, fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática, inhibiendo la función del PAI-1 humano activo.

10

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un efecto inhibitor de HOT-1 completamente humano en PAI-1 activo en sangre de mono. El eje vertical indica una concentración de PAI-1 activo en el plasma.

15

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación se describirá con detalle la presente invención.

20

Hay cinco clases de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE en un anticuerpo. La estructura básica de una molécula de anticuerpo está configurada de cadenas pesadas que tienen un peso molecular de 50.000 a 70.000 y cadenas ligeras que tienen un peso molecular de 20.000 a 30.000 en cada una de las clases en común. La cadena pesada consiste normalmente en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 440 aminoácidos, tiene una estructura distintiva para cada una de las clases y se denomina como I γ , I μ , I α , I δ e I ϵ que se corresponden con IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Además, hay presentes cuatro subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en IgG y las cadenas pesadas que se corresponden respectivamente a las mismas se denominan como I γ 1, I γ 2, I γ 3 e I γ 4. La cadena ligera consiste normalmente en una cadena polipeptídica que comprende 220 aminoácidos, dos tipos de los cuales, el tipo L y el tipo K son conocidos, y se denominan como I λ e I κ . En una configuración peptídica de la estructura básica de las moléculas de anticuerpo, dos cadenas pesadas homólogas y dos cadenas ligeras homólogas se unen mediante enlaces disulfuro (enlace S-S) y enlaces no covalentes, y el peso molecular de los mismos es de 150.000 a 190.000. Se pueden emparejar dos tipos de cadenas ligeras con cualquier cadena pesada. Las respectivas moléculas de anticuerpo consisten normalmente en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

25

30

35

Con respecto a enlaces S-S intracatenarios, cuatro de los enlaces S-S están presentes en la cadena pesada (cinco en I μ e I ϵ) y dos de ellos están presentes en la cadena ligera; se forma un bucle por 100 a 110 restos de aminoácidos y esta estructura estérica es similar entre los bucles y se denomina como una unidad estructural o dominio. El dominio ubicado en el lado del extremo N-terminal en tanto la cadena pesada como la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos no es constante incluso en un caso de una muestra de la misma clase (subclase) del mismo tipo de animal se denomina como una región variable, y dominios respectivos se denominan como una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L). La secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de la región variable es casi constante en cada clase o subclase y se denomina como una región constante (cada uno de los dominios se denomina C_H1, C_H2, C_H3 y C_L, respectivamente).

40

45

Un sitio determinante antigénico de un anticuerpo está configurado de V_H y V_L y la especificidad de unión depende de la secuencia de aminoácidos de este sitio. Por otro lado, actividades biológicas tales como la unión a complementos y diversas células que expresan receptor de Fc reflejan diferencias en las estructuras de región constante entre cada clase de Ig. Se entiende que la variabilidad de regiones variables de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas queda limitada en su mayoría a tres pequeñas regiones hipervariables presentes en ambas cadenas y estas regiones se denominan como regiones determinantes de complementariedad (CDR: CDR1, CDR2 y CDR3 desde el extremo N-terminal). La porción restante de la región variable se denomina como una región marco (FR) y es relativamente constante.

50

55

Además, diversos tipos de fragmentos de unión a antígeno que comprenden V_H y V_L de un anticuerpo tienen actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, un fragmento de región variable monocatenario (scFv), Fab, Fab' y F(ab')₂ se ejemplifican como fragmentos de unión a antígeno típicos. Un Fav es un fragmento de unión a antígeno monovalente que está constituido con un fragmento de cadena ligera y de cadena pesada que incluye V_H, un C_H1 y una porción de la región de bisagra. Un Fab' es un fragmento de unión a antígeno monovalente que está constituido con un fragmento de cadena ligera y de cadena pesada que incluye un V_H, un C_H1 y una porción de la región de bisagra, y los restos cisteína que constituyen el enlace S-S de intracadena pesada se incluyen en la porción de la región de bisagra. Un fragmento F(ab')₂ es un fragmento de unión a antígeno bivalente en el que dos fragmentos Fab' se unen entre sí mediante el enlace S-S de intracadena pesada en la región de bisagra. Un scFv es un fragmento de unión a antígeno monovalente que está constituido con un V_H y V_L conectados con un enlazador.

60

65 <Anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención>

El anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

5 Un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID: 4.

10 Preferentemente, el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención tiene las características anteriores y comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera. Como la región constante, se puede seleccionar cualquier subclase de región constante (por ejemplo, una región constante de Igy1, Igy2, Igy3 o Igy4 como la región constante de cadena pesada y una región constante de Igl o Igk como la región constante de cadena ligera), pero la región constante de la Igy1 humana es preferente como la región constante de cadena pesada.

15 Una región constante de Igy1 humana incluye, por ejemplo, región constante de Igy1 humana que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 119 a 448 de la SEQ ID NO: 2.

20 Es preferente una región constante de Igk humana como la región constante de cadena ligera

Una región constante de Igk humana incluye, por ejemplo, región constante de Igk humana que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 109 a 214 de la SEQ ID NO: 4.

25 Como el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera anteriores, en las que la región constante de cadena pesada es la región constante de Igy1 humana y la región constante de cadena ligera es la región constante de Igk humana es aún más preferente.

30 En una realización, el fragmento de unión a antígeno de la presente invención es scFv, Fab, Fab' o F(ab')₂.

En una realización, el anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención es un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

35 Se sabe que cuando un anticuerpo se expresa en células, el anticuerpo se modifica después de su traducción. Ejemplos de la modificación postraduccional incluye la escisión de lisina en el C-terminal de la cadena pesada mediante una carboxipeptidasa; la modificación de glutamina o ácido glutámico en el N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera con respecto a ácido piroglutámico mediante piroglutamilación; glicosilación; oxidación; desamidación; y glicación, y se sabe que tales modificaciones postraduccionales se producen en diversos anticuerpos (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Vol. 97, pág. 2426-2447).

45 El anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo procedente de la modificación postraduccional. Ejemplos del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que procede de modificación postraduccional, incluyen anticuerpos anti-PAI-1 humanos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se han sometido a piroglutamilación en el extremo N de la región variable de cadena pesada y/o eliminación de lisina en el extremo C de la cadena pesa. Se sabe en el campo que tal modificación postraduccional debida a la piroglutamilación en el extremo N y la eliminación de lisina en el extremo C no tiene ninguna influencia en la actividad del anticuerpo (Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, pág. 24-39).

55 En una realización, el anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención es un anticuerpo anti-PAI-1 humano que tiene las siguientes características.

Un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la cual el ácido glutámico del aminoácido número 1 se modifica a ácido piroglutámico y/o la lisina del aminoácido número 448 se elimina en SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

60 En otra realización, el anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención es un anticuerpo anti-PAI-1 humano que tiene las siguientes características.

65 El anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

La presente invención incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características.

5 Un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 2, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 50 a 66 de la SEQ ID NO: 2 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 99 a 107 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 24 a 34 de la SEQ ID: 4, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 50 a 56 de la SEQ ID NO: 4 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 89 a 97 de la SEQ ID: 4.

15 El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un anticuerpo que se une a PAI-1 humano activo que forma complejo con vitronectina (también denominado como complejo de VTN-PAI-1). Ejemplos de PAI-1 humano activo presente en el organismo incluye PAI-1 humano activo que está presente como un monómero y un complejo de VTN-PAI-1. Con respecto al complejo VTN-PAI-1 entre ellos, el cambio conformacional desde la forma activa de PAI-1 humano a la forma latente del mismo se inhibe mediante unión de PAI-1 a vitronectina, mediante la cual, la estructura de PAI-1 humano activo es más estable de mantener que PAI-1 humano activo que está presente como un monómero. Además, el bucle de centro activo de PAI-1 humano activo no se ve afectado en el complejo de VTN-PAI-1 (Nat. Struct. Biol., 2003, Vol. 10, pág. 541-544). Por lo tanto, la selectividad de un anticuerpo para PAI-1 humano activo puede estimarse de forma más precisa evaluando la actividad de unión del anticuerpo anti-PAI-1 humano para el complejo de VTN-PAI-1.

25 Además, el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también incluye un anticuerpo que también se une a PAI-1 humano activo que está presente como un monómero, así como un a un complejo de VTN-PAI-1.

30 Si tal anticuerpo se une o no al complejo de VTN-PAI-1 o PAI-1 activo que está presente como un monómero se puede confirmar usando un método conocido de medición de una actividad de unión. Ejemplos del método de medición de una actividad de unión incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y resonancia de plasmón superficial (SPR). En el caso de utilizar ELISA, en un método a modo de ejemplo, se inmoviliza vitronectina (BD Biosciences, 354238), seguido por su bloqueo y, a continuación, se inmoviliza PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) para inmovilizar, de este modo, un complejo de VTN-PAI-1. Se añade un anticuerpo de ensayo y se hacer reaccionar con este. A continuación le sigue una reacción con un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo anti-IgG etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) o similar, lavado y, a continuación, medición de la actividad usando un reactivo de detección de actividad (por ejemplo, en el caso de etiquetado con HRP, un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)) o similar, mediante el cual es posible confirmar si el anticuerpo de ensayo se une o no al complejo de VTN-PAI-1. En el caso de utilizar SPR, por ejemplo, se puede usar Biacore (marca comercial registrada) T200 (GE Healthcare Japan). En un método a modo de ejemplo, el anticuerpo de ensayo se inmoviliza sobre la superficie de un chip sensor y se añade a la trayectoria de flujo PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A). Si el anticuerpo de ensayo de une o no a PAI-1 humano activo que está presente como un monómero se puede confirmar analizando una constante de tasa de asociación (ka), una constante de tasa de disociación (kd) y una constante de disociación (KD) del anticuerpo y el PAI-1 humano activo.

45 Preferentemente, el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un anticuerpo que se une a un complejo de VTN-PAI-1 y tiene una actividad inhibitora sobre PAI-1 humano activo en el plasma. Más preferentemente, el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un anticuerpo que se une a un complejo de VTN-PAI-1, tiene una actividad inhibitora sobre PAI-1 humano activo en el plasma y no se une a PAI-1 humano latente y PAI-1 humano que forma complejo con PA. El método tal como se ha descrito en el Ejemplo 5 a continuación se puede usar como un método para evaluar específicamente una actividad inhibitora sobre PAI-1 humano activo en el plasma.

55 La expresión "no se une a PAI-1 humano latente" se refiere a un valor de CE50 (ng/ml) > 10.000 en el caso de evaluar la actividad de unión de un anticuerpo para PAI-1 humano latente y la expresión "valor de CE50 (ng/ml) > 10.000" se refiere a que una concentración de anticuerpo que muestra el 50 % de mediana de actividad máxima es superior a 10.000 ng/ml. El método usado para esa evaluación es como se muestra a continuación.

(Evaluación de actividad de unión para PAI-1 humano latente)

60 Se diluye PAI-1 humano latente recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-L) en 1.000 ng/ml de tampón fosfato salino (PBS) y se añade a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se deja reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el PAI-1 humano latente. La solución de recubrimiento se retira mediante centrifugación inversa y se añade un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lava con solución de lavado (solución salina tamponada con Tris (TBS) que contiene 0,05 % de Tween-20) y un anticuerpo de

ensayo, que se diluyó en ocho etapas en un intervalo de 100.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con PBS que contiene 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA), se añade a 100 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada uno de MEDI-579 (Documento de patente 3) como anticuerpo comparativo en el caso en el que el anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc humana y MA-56A7C10 (Hycult Biotech Inc., HM2182) como anticuerpo comparativo en el caso en el que el anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc de ratón se diluye en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con 0,1 % de PBS que contiene BSA y, a continuación, se añade a los pocillos. Se preparó como control un pocillo al cual se añadió 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo. Después de lavarlo tres veces con una solución de lavado, se añade a 100 µl/pocillo un anticuerpo de detección diluido 2.000 veces usando una solución de agente de bloqueo (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se diluyó 20 veces en PBS seguido por la reacción. Un anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón etiquetado con HRP (Southern Biotech, 1010-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región Fc de un anticuerpo de ratón y un anticuerpo de conejo anti-Ig humano etiquetado con HRP (Southern Biotech, 6145-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región de Fc de un anticuerpo humano se usan como el anticuerpo de detección. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron las placas tres veces con una solución de lavado. Una solución de desarrollo de color contenida en un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se añade a 100 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, se añaden 100 µl de una solución de detención de reacción contenida en el kit de desarrollo de color y, a continuación se mide el valor de DO450 usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.). En conexión con el cálculo de una tasa de unión de PAI-1 en cada concentración de un anticuerpo de ensayo, el valor de medición del pocillo al que se agregó 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo se toma para que sea el 0 % y el valor de medición en la concentración máxima de un anticuerpo de ensayo se establece al 100 %. Mientras tanto, en el caso en el que un anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc humana, el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en un sistema de evaluación se establece al 100 % cuando se añade un anticuerpo de ensayo a la concentración máxima (100.000 ng/ml) pero el valor de medición no alcanza el valor de medición de la concentración máxima (10.000 ng/ml) de MEDI-579 en el sistema de evaluación. En el caso en el que un anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc de ratón, el valor de medición de la concentración máxima de MA-56A7C10 en un sistema de evaluación se establece al 100 % cuando se añade un anticuerpo de ensayo a la concentración máxima (100.000 ng/ml) pero el valor de medición no alcanza el valor de medición de la concentración máxima (10.000 ng/ml) de MA-56A7C10 en el sistema de evaluación. Se analiza la tasa de unión a PAI-1 y se calcula un valor CE50 del anticuerpo de ensayo mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

La expresión "no se une a PAI-1 que forma complejo con un activador del plasminógeno" se refiere a un valor de CE50 (ng/ml) > 10.000 para cada complejo en el caso de evaluar la actividad de unión de un anticuerpo para PAI-1 humano que forma complejo con uPA o tPA que es un activador del plasminógeno (PA) (cada uno de los cuales se denomina como complejo uPA-PAI-1 y complejo tPA-PAI1) y la expresión "valor de CE50 (ng/ml) > 10.000" se refiere a que una concentración de anticuerpo que muestra el 50 % de la actividad máxima es superior a 10.000 ng/ml. El método usado para esa evaluación es como se muestra a continuación.

(Evaluación de actividad de unión de complejo uPA-PAI-1)

uPA (unidades de urocinasa intravenosa 6×10^4 "Benesis (marca comercial registrada)"; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) se diluye en 100 unidades/ml en PBS y se añade a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se deja reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el uPA. La solución de recubrimiento se retira mediante centrifugación inversa y se añade un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añade PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) diluido a 1.000 ng/ml en 0,1 % de PBS que contiene BSA a 100 µl/pocillo y se deja capturar sobre el uPA. La placa se lava con solución de lavado (0,05 % de TBS que contiene Tween-20) y un anticuerpo de ensayo, que se diluyó en ocho etapas en un intervalo de 100.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con 0,1 % de PBS que contiene BSA, se añade a 100 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada uno de MEDI-579 (Documento de patente 3) como anticuerpo comparativo en el caso en el que el anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc humana y MA-56A7C10 (Hycult Biotech Inc., HM2182) como anticuerpo comparativo en el caso en el que el anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc de ratón se diluye en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con 0,1 % de PBS que contiene BSA y, a continuación, se añade a los pocillos. Se preparó como control un pocillo al cual se añadió 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo. Después de lavarlo tres veces con una solución de lavado, se añade a 100 µl/pocillo un anticuerpo de detección diluido 2.000 veces usando una solución de agente de bloqueo (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se diluyó 20 veces en PBS, seguido por la reacción. Un anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón etiquetado con HRP (Southern Biotech, 1010-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región Fc de un anticuerpo de ratón y un anticuerpo de conejo anti-Ig humano etiquetado con HRP (Southern Biotech, 6145-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región de Fc de un anticuerpo humano se usan como el anticuerpo de detección. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron las placas tres veces con una solución de lavado. Una solución de desarrollo de color contenida en un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se añade a 100 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, se añaden 100 µl de una solución de detención de reacción contenida en el kit de desarrollo de color y, a continuación se mide

el valor de DO450 usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.). En conexión con el cálculo de una tasa de unión de PAI-1 en cada concentración de un anticuerpo de ensayo, el valor de medición del pocillo al que se agregó 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo se toma para que sea el 0 % y el valor de medición en la concentración máxima de un anticuerpo de ensayo se establece al 100 %. Mientras tanto, en el caso en el que un anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc humana, el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en un sistema de evaluación se establece al 100 % cuando se añade un anticuerpo de ensayo a la concentración máxima (100.000 ng/ml) pero el valor de medición no alcanza el valor de medición de la concentración máxima (10.000 ng/ml) de MEDI-579 en el sistema de evaluación. En el caso en el que un anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc de ratón, el valor de medición de la concentración máxima de MA-56A7C10 en un sistema de evaluación se establece al 100 % cuando se añade un anticuerpo de ensayo a la concentración máxima (100.000 ng/ml) pero el valor de medición no alcanza el valor de medición de la concentración máxima (10.000 ng/ml) de MA-56A7C10 en el sistema de evaluación. Se analiza la tasa de unión a PAI-1 y se calcula un valor CE50 del anticuerpo de ensayo mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

15 (Evaluación de actividad de unión de complejo de tPA-PAI-1)

Se diluye tPA (marca comercial registrada) para inyección 6.000.000; Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) se diluye en 1.000 unidades/ml en PBS y se añade a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se deja reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el tPA. La solución de recubrimiento se retira mediante centrifugación inversa y se añade un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añade PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) diluido a 1.000 ng/ml en 0,1 % de PBS que contiene BSA a 100 µl/pocillo y se deja capturar sobre el tPA. La placa se lava con solución de lavado (0,05 % de TBS que contiene Tween-20) y un anticuerpo de ensayo, que se diluyó en ocho etapas en un intervalo de 100.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con 0,1 % de PBS que contiene BSA, se añade a 100 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada uno de MEDI-579 (Documento de patente 3) como anticuerpo comparativo en el caso en el que el anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc humana y MA-56A7C10 (Hycult Biotech Inc., HM2182) como anticuerpo comparativo en el caso en el que el anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc de ratón se diluye en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con 0,1 % de PBS que contiene BSA y, a continuación, se añade a los pocillos. Como control, se preparó un pocillo al cual se añadió 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo. Después de lavarlo tres veces con una solución de lavado, se añade a 100 µl/pocillo un anticuerpo de detección diluido 2.000 veces usando una solución de agente de bloqueo (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se diluyó 20 veces en PBS, seguido por la reacción. Un anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón etiquetado con HRP (Southern Biotech, 1010-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región Fc de un anticuerpo de ratón y un anticuerpo de conejo anti-Ig humano etiquetado con HRP (Southern Biotech, 6145-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región de Fc de un anticuerpo humano se usan como el anticuerpo de detección. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron las placas tres veces con una solución de lavado. Una solución de desarrollo de color contenida en un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se añade a 100 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, se añaden 100 µl de una solución de detención de reacción contenida en el kit de desarrollo de color y, a continuación se mide el valor de DO450 usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.). En conexión con el cálculo de una tasa de unión de PAI-1 en cada concentración de un anticuerpo de ensayo, el valor de medición del pocillo al que se agregó 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo se toma para que sea el 0 % y el valor de medición en la concentración máxima de un anticuerpo de ensayo se establece al 100 %. Mientras tanto, en el caso en el que un anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc humana, el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en un sistema de evaluación se establece al 100 % cuando se añade un anticuerpo de ensayo a la concentración máxima (100.000 ng/ml) pero el valor de medición no alcanza el valor de medición de la concentración máxima (10.000 ng/ml) de MEDI-579 en el sistema de evaluación. En el caso en el que un anticuerpo de ensayo tiene una región de Fc de ratón, el valor de medición de la concentración máxima de MA-56A7C10 en un sistema de evaluación se establece al 100 % cuando se añade un anticuerpo de ensayo a la concentración máxima (100.000 ng/ml) pero el valor de medición no alcanza el valor de medición de la concentración máxima (10.000 ng/ml) de MA-56A7C10 en el sistema de evaluación. Se analiza la tasa de unión a PAI-1 y se calcula un valor CE50 del anticuerpo de ensayo mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que inhibe la unión de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO: 4 a PAI-1 humano activo, se une a PAI-1 humano activo que forma complejo con vitronectina y no se une a PAI-1 humano latente y PAI-1 humano que forma complejo con un activado del plasminógeno.

Si un anticuerpo de ensayo inhibe o no la unión de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena

pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 a PAI-1 humano activo
 5 puede confirmarse usando el siguiente método. se inmoviliza vitronectina (BD Biosciences, 354238), seguido por su bloqueo y, a continuación, se inmoviliza PAI-1 humano activo (Molecular Innovations Inc., PAI-A) para inmovilizar, de este modo, un complejo de VTN-PAI-1. Se añade un anticuerpo de ensayo y se hacer reaccionar con este. A esto le sigue la reacción con un anticuerpo secundario de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, que se ha etiquetado con HRP o similar, el lavado y, a continuación, la medición de actividad usando un reactivo de detección de actividad (por ejemplo, en el caso de etiquetado con HRP, un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)) o similar. En el caso en el que la actividad de unión de un anticuerpo secundario de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 se ve significativamente reducido por la adición de un anticuerpo de ensayo, se puede determinar que el anticuerpo de ensayo inhibe o no la unión de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 a PAI-1 humano activo.

El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de PAI-1 humano que el anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o el anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO: 4. Como se usan en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a un sitio antigénico que se reconoce por un anticuerpo.

Si un anticuerpo de ensayo se une o no al mismo epítipo de PAI-1 humano que el anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o el anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 se puede confirmar usando un método de determinación de epítipo conocido. Ejemplos del método de determinación de un epítipo incluyen métodos tales como análisis de estructura cristalina de rayos X y ELISA. En el caso de utilizar ELISA, en un método a modo de ejemplo, se inmoviliza un péptido parcial de PAI-1 humano y se añade un anticuerpo de ensayo y se hacer reaccionar con este. A continuación le sigue una reacción con un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo anti-IgG etiquetado con HRP o similar, el lavado y, a continuación, la medición de actividad usando un reactivo de detección de actividad (por ejemplo, en el caso de etiquetado con HRP, un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)) o similar, mediante el cual es posible confirmar si el anticuerpo de ensayo se une o no al péptido parcial de PAI-1 humano. El epítipo del anticuerpo de ensayo puede determinarse mediante la evaluación de la actividad de unión a péptidos parciales de PAI-1 humano que tienen secuencias de aminoácidos distintas. En el caso en el que el epítipo del anticuerpo de ensayo es el mismo que el epítipo de un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, se puede determinar que el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo de PAI-1 humano que el anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

Además, el anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención también incluye un anticuerpo que se une a PAI-1 activo procedente de otros animales y que forma complejo con vitronectina (por ejemplo, PAI-1 de mono activo que forma complejo con vitronectina) así como a un complejo de VTN-PAI-1, siempre y cuando es un anticuerpo que se une al complejo de VTN-PAI-1.

El anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención puede prepararse fácilmente por un experto en la materia utilizando un método conocido en el campo, basándose en información de secuencia sobre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la invención, que se desvela en la presente memoria descriptiva. El anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención no está particularmente limitado, sino
 5 que puede producirse de acuerdo con el método descrito en la sección de <Método de producción de anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y anticuerpo anti-PAI-1 humano producido mediante el método> que se describe a continuación.

El anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención se purifica adicionalmente si se desea y, a continuación,
 10 se formula de acuerdo con un método convencional y se puede usar para la prevención o tratamiento de enfermedades en las que el PAI-1 activo está implicado en la patogénesis de la misma, por ejemplo, fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, nefropatía diabética, nefritis por lupus, enfermedad del injerto contra el huésped, glomerulonefritis, síndrome nefrótico, fibrosis renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión renal aguda, lesión pulmonar aguda,
 15 insuficiencia respiratoria aguda, degeneración macular asociada a la edad, coagulación intravascular diseminada, adherencia postquirúrgica, adherencia vitreomacular sintomática, retinopatía diabética, arteriosclerosis, infarto de miocardio, infarto cerebral, infarto pulmonar, enfermedad acompañante de fibrosis ocular tal como cicatrización de la conjuntiva después de cirugía de glaucoma, esclerosis peritoneal y enfermedades similares.

20 <Polinucleótido de la presente invención>

El polinucleótido de la presente invención incluye un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la
 25 región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

En una realización, el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2.
 30

El polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada que se muestra por la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 incluye, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de bases de los números de base 1 a 354 de la SEQ ID NO: 1.
 35

En una realización preferida, el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención es un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2.
 40

Ejemplos del polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 incluye un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 1.
 45

En una realización, el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID NO: 4.
 50

Ejemplos del polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID NO: 4 incluyen un polinucleótido que comprende una secuencia de bases de los números de base 1 a 324 de la SEQ ID NO: 3.
 55

En una realización preferida, el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.
 60

Ejemplos del polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4 incluye un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 3.
 65

El polinucleótido de la presente invención puede prepararse fácilmente por un experto en la materia utilizando un método conocido en el campo basándose en la secuencia de bases. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede sintetizarse usando un método de síntesis génica conocido en el campo. Como el método de

síntesis génica, se pueden usar diversos métodos conocidos por un experto en la técnica tales como un método de síntesis de genes de anticuerpos que se describe en el documento WO90/07861.

<Expresión de vector de la presente invención>

5 Un vector de expresión de la presente invención incluye un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y el polinucleótido que comprende la
10 secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

15 Vectores de expresión preferentes de la presente invención incluyen un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

20 El vector de expresión usado para expresar el polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado siempre y cuando un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se pueda
25 expresar en diversas células hospedadoras de células eucariotas (por ejemplo, en células animales, células de insecto, células vegetales y levadura) y/o células procariotas (por ejemplo, Escherichia coli) y se pueden producir los polipéptidos codificados por estos. Ejemplos del vector de expresión incluyen vectores plasmídicos, vectores víricos (por ejemplo, adenovirus o retrovirus) y similares. Preferentemente se puede usar pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza, Inc.). Además, se pueden expresar genes de anticuerpos transfiriendo con anterioridad un fragmento de gen de región variable a vectores de expresión que comprenden genes de región constante de Ig humana tal como AG-γ1 o AG-κ (por ejemplo, véase el documento WO94/20632).

30 El vector de expresión de la presente invención puede incluir un promotor que está operativamente unido al polinucleótido de la presente invención. Ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de la invención con células animales incluyen un promotor procedente de virus tal como CMV, RSV o SV40, un promotor de actina, un promotor de EF (factor de elongación) α 1 y un promotor de choque térmico. Ejemplos de promotores para la
35 expresión por bacterias (por ejemplo, Escherichia) incluyen un promotor de trp, un promotor de lac, un promotor λPL y un promotor de tac. Además, ejemplos de promotores para su expresión por levadura incluyen un promotor de GAL1, un promotor de GAL10, un promotor de PH05, un promotor de PGK, un promotor de GAP y un promotor de ADH.

40 En el caso de utilizar una célula animal, una célula de insecto o levadura como la célula hospedadora, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de terminación. En este caso, el vector de expresión de la presente invención puede comprender una secuencia potenciadora, una región no traducida en el extremo 5' y en el extremo 3' de genes que codifican el anticuerpo de la presente invención o la
45 región variable de la cadena pesada o la región variable de cadena ligera, una secuencia de señal secretora, un punto de unión de corte y empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable. Cuando se usa Escherichia coli como la célula hospedadora, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio, un codón de terminación, una región terminadora y un replicón. En este caso, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un marcador de selección (por ejemplo, genes de resistencia a tetraciclina, genes de resistencia a ampicilina, genes de resistencia a kanamicina, genes de resistencia a neomicina o genes de dihidrofolato reductasa) que se usan, en general, según la necesidad.

50 <Célula hospedadora transformada de la presente invención>

La célula hospedadora de la presente invención incluye una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la presente invención que se selecciona del grupo que consiste en el siguiente de (a) a (b):

55 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento
60 de unión a antígeno del mismo; y

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un vector de expresión que
65 comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, la célula hospedadora de la presente invención es una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la presente invención que se selecciona del grupo que consiste en el siguiente de (a) a (b):

- 5 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo; y
- 10 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

15 Ejemplos preferentes de la célula hospedadora transformada de la presente invención incluyen una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo, y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

25 La célula hospedadora transformada no está particularmente limitada siempre y cuando la célula hospedadora sea adecuada para el vector de expresión que está siendo usado, transformada con el vector de expresión y pueda expresar el anticuerpo. Ejemplos de la célula hospedadora transformada incluyen diversas células tales como células naturales o células establecidas artificialmente que se usan, en general, en el campo de la presente invención (por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHO-K1SV), células de insecto (por ejemplo, Sf9), bacterias (por ejemplo, Escherichia), levadura (por ejemplo, Saccharomyces o Pichia) o similares). Se pueden usar preferentemente células cultivadas tales como células CHO (tales como células CHO-K1SV y células CHO-DG 44), células 293 o células NSO.

30 Un método de transformación de la célula hospedadora no está particularmente limitado, pero, por ejemplo, se puede usar un método de fosfato de calcio o un método de electroporación.

35 <Método de producción de anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y anticuerpo anti-PAI-1 humano producido mediante el método>

40 El método de producción del anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluye un método de producción de un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en el siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo:

- 45 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo;
- 50 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; y
- 55 (c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

60 En una realización, el método de producción del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención incluye un método de producción de un anticuerpo anti-PAI-1 humano, que comprende cultivar célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en el siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano:

- 65 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo;

(b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo; y

5 (c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de la presente invención y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

10 El método de producción del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención no está particularmente limitado siempre y cuando incluya una etapa de cultivo de las células hospedadoras transformadas de la presente invención para que expresen el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de las células hospedadoras preferentes usadas en el método incluyen las células hospedadoras transformadas preferentes de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente.

La célula hospedadora transformada puede cultivarse mediante cualquier método conocido. Se seleccionan de forma adecuada las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio de cultivo y el tiempo de cultivo. En un caso en el que la célula huésped es una célula animal, ejemplos del medio de cultivo incluyen medio de cultivo MEM complementado con aproximadamente del 5 % al 20 % de suero bovino fetal (Science, 1959, Vol. 130, N.º 3373, pág. 432-7), medio de cultivo DMEM (Virology, 1959, Vol. 8, pág. 396) y medio de cultivo RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, pág. 519) un medio de cultivo 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, pág. 1-8). El pH del medio de cultivo es preferentemente de aproximadamente 6 a 8 y el cultivo se lleva a cabo, en general, a aproximadamente de 30 °C a 40 °C durante aproximadamente 15 horas a 72 horas mientras hay ventilación de aire y agitación si fuera necesario. En un caso en el que la célula huésped es una célula de insecto, como medio de cultivo, por ejemplo, se puede usar medio de cultivo de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, Vol. 82, pág. 8404) complementado con suero bovino fetal. El pH del medio de cultivo es preferentemente de aproximadamente 5 a 8 y el cultivo se lleva a cabo, en general, a aproximadamente de 20 °C a 40 °C durante aproximadamente 15 horas a 100 horas mientras hay ventilación de aire y agitación si fuera necesario. En un caso en el que la célula huésped es Escherichia coli o levadura, como medio de cultivo, por ejemplo, es adecuado medio de cultivo líquido complementado con una fuente de nutrientes. Es preferente que el medio de cultivo de nutrientes incluya una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico necesaria para el crecimiento de la célula hospedadora transformada. Ejemplos de la fuente de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón soluble y sacarosa y ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánica o la fuente de nitrógeno orgánica incluyen sales de amonio, sales de nitrato, aminoácidos, agua de remojo de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja y extracto de patata. Otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio), vitamina) y antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina y kanamicina) se pueden incluir según se desee. El pH del medio de cultivo es preferentemente aproximadamente de 5 a 8. En un caso en el que la célula huésped es Escherichia coli, ejemplos preferentes del medio de cultivo incluyen medio de cultivo de LB y medio de cultivo de M9 (Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, Vol. 3, A2.2). El cultivo se lleva a cabo, en general, a aproximadamente de 14 °C a 39 °C durante aproximadamente 3 horas a 24 horas mientras hay ventilación de aire y agitación si fuera necesario. En un caso en el que la célula huésped es levadura, como medio de cultivo, por ejemplo, se puede usar medio de cultivo de Burkholder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, Vol. 77, pág. 4505). El cultivo se lleva a cabo, en general, a aproximadamente de 20 °C a 35 °C durante aproximadamente 14 horas a 144 horas mientras hay ventilación de aire y agitación si fuera necesario. Llevando a cabo el cultivo del modo anteriormente descrito, es posible expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

El método de producción del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede incluir la obtención, preferentemente aislamiento o purificación del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula hospedadora transformada además del cultivo de la célula hospedadora transformada de la presente invención para que exprese el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo. Ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen métodos que usan solubilidad tal como desalación y el método de precipitación con disolvente, métodos que usan la diferencia en el peso molecular tales como diálisis, ultrafiltración y filtración en gel, métodos que usan una carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de hidroxilapatita, métodos que usan afinidad específica tales como cromatografía de afinidad, métodos que usan la diferencia en hidrofobicidad tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa y métodos que usan la diferencia en el punto isoeléctrico tales como forésis de electroenfoque. Preferentemente, el anticuerpo acumulado en un sobrenadante del cultivo puede purificarse mediante diversas cromatografías, por ejemplo, cromatografía en columna usando columna de Proteína A o columna de Proteína G.

El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante el método de producción del anticuerpo anti-PAI-1 humano o fragmento del mismo de la presente invención.

<Composición farmacéutica de la presente invención>

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse mediante un método que se usa, en general, con excipientes, es decir, excipientes para medicamentos, vehículos para medicamentos y similares que se usan, en general, en el campo. Ejemplos de forma de dosificación de las composiciones farmacéuticas incluyen fármaco parenteral tal como un fármaco de inyección y un fármaco de infusión por goteo y estas se pueden administrar mediante administración por vía intravenosa, administración subcutánea o similares. En la preparación de fármacos, se pueden usar excipientes, vehículos, aditivos y similares según las formas de dosificación dentro del intervalo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir plurales tipos de anticuerpo anti-PAI-1 humanos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que no se somete a modificación postraducciona l y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo procedente de una modificación postraducciona l del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluye una composición farmacéutica que se describe a continuación.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID: 4 y un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que procede de la modificación postraducciona l del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo en el que se elimina lisina del C-terminal de la cadena pesada, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con modificación postraducciona l a N-terminal, un anticuerpo en el que se elimina la lisina del C-terminal de la cadena pesada y se realiza modificación postraducciona l a N-terminal y/o un anticuerpo que tiene lisina del C-terminal de la cadena pesada y no tiene modificación postraducciona l a N-terminal.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un anticuerpo anti-PAI-1 humano, incluye una composición farmacéutica que comprende al menos dos tipos de anticuerpos anti-PAI-1 humanos seleccionados de los siguientes (1) a (4).

(1) Un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

(2) Un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la cual el ácido glutámico de aminoácido número 1 se modifica a ácido piroglutámico y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

(3) Un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 en el que el ácido glutámico del aminoácido número 1 se modifica a ácido piroglutámico y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

(4) Un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluye una composición farmacéutica que comprende que se describe a continuación.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4; un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de adición del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en la formulación anterior varía dependiendo del grado de los síntomas del paciente, la edad del paciente, la forma de dosificación del fármaco a usar, el título de unión del anticuerpo o similares y, por ejemplo, se puede usar la cantidad de adición de aproximadamente de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg.

5 La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como un agente para prevenir o tratar una enfermedad en la que el PAI-1 humano activo está implicado en la patogénesis de la misma, por ejemplo, fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática.

10 La presente invención incluye una composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática, que comprende el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Además, la presente invención describe un método de tratamiento o prevención de fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática, que comprende una etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Además, la presente invención incluye el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para su uso en la prevención o tratamiento de fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática. Además, la presente invención incluye el uso del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática.

<Anticuerpo de fusión y anticuerpo modificado>

25 Cualquier experto en la técnica puede preparar un anticuerpo de fusión de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con otro péptido o proteína y también puede preparar un anticuerpo modificado que tiene un agente modificador unido al mismo, utilizando un método conocido en la técnica. El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también incluye un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno del mismo en la forma de tal fusión o modificación. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID: 4 también incluye un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo fusionado con otro péptido o proteína y un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene un agente modificador unido al mismo. El otro péptido o proteína usada para la fusión no queda particularmente limitado, siempre y cuando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como anticuerpo de fusión tenga una actividad de unión a un complejo de VTN-PAI-1; ejemplos de los mismos incluyen albúmina de suero humano, diversos péptidos de marcador, péptido de motivo de hélice artificial, proteínas de unión a maltosa, glutatión S-transferasa, diversas toxinas, otros péptidos o proteínas capaces de promover la multimerización y similares. El agente modificador usado para la modificación no está particularmente limitado, siempre y cuando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como anticuerpo modificado tenga una actividad de unión a un complejo de VTN-PAI-1; ejemplos de los mismos incluyen polietilenglicol, cadenas de azúcar, fosfolípidos, liposomas, compuestos de bajo peso molecular y similares.

45 La presente invención se ha descrito y se proporcionarán ejemplos referidos para una mejor comprensión, pero estos son meramente ejemplos y la presente invención no se limita a los mismos.

[Ejemplos]

50 Con respecto a partes que usan kits o reactivos comercialmente disponibles, los experimentos se llevaron a cabo según el protocolo adjunto a menos que se indique lo contrario. Por razones de conveniencia, la concentración mol/l se expresa como M. Por ejemplo, 1M de solución acuosa de hidróxido de sodio se refiere a 1 mol/l de solución acuosa de hidróxido de sodio.

(Ejemplo 1: Examen de antígeno inmunizante y preparación de hibridoma que produce anticuerpo anti-PAI-1 humano)

55 Para obtener un anticuerpo que tiene una alta selectividad para PAI-1 humano activo, se realizó un examen sobre el antígeno peptídico de PAI-1 humano óptimo. Como resultado de examinar la longitud del péptido y la secuencia de aminoácidos, se halló que es posible obtener un anticuerpo que neutraliza PAI-1 humano activo en el plasma, en el caso en el que un antígeno peptídico que tiene un péptido de Péptido de antígeno múltiple 8 (MAP8) (J. Biol. Chem., 1988, Vol. 263, N.º 4, págs. 1719-1725) conectado al C-terminal de un antígeno peptídico STAVIVSARMAPEEII (SEQ ID NO: 5) de 16 restos de aminoácidos en PAI-1 humano se inmunizan. Como resultado adicional de un examen inventivo sobre proteínas que están conectadas a un antígeno, métodos inmunitarios y similares, se halló que es posible obtener un anticuerpo que neutraliza potencialmente PAI-1 humano activo en el plasma y tiene una alta selectividad de PAI-1 humano activo que forma complejo con vitronectina (complejo de VTN-PAI-1), en el caso en el que un antígeno peptídico que tiene una proteína de Hemocianina de Lapa de ojo de la cerradura (KLH)

conectada al C-terminal de tal antígeno peptídico y PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) se mezclan e inmunizan simultáneamente.

5 Tecnología de desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos "Velolmmune" (Veloclmmune antibody technology: Regeneron, nc. (Patente de los EE.UU. n.º 6596541)) se usaron ratones para preparar un anticuerpo. Específicamente, un antígeno peptídico que tiene una proteína de KLH conectada al C-terminal de un antígeno peptídico STAVIVSARMAPEEII (SEQ ID NO: 5) de 16 restos aminoácidos en PAI-1 humano y PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) se inmunizaron en ratones Velolmmune, junto con un adyuvante que provoca una reacción inmunitaria. Los ratones se inmunizaron varias veces para confirmar un aumento en el título de anticuerpos en el plasma. Por último, la inmunización se llevó a cabo siete veces. Posteriormente, según un método convencional, se extrajo el nódulo linfático de los ratones inmunizados y se recogieron linfocitos y se fusionaron con células con células de mieloma de ratón (SP2/0(ATCC: CRL-1581) preparando, de este modo, hibridomas. Se prepararon muestras de dilución limitantes de hibridomas para llevar a cabo la monoclonación. Cada clon se sometió a cultivo de expansión. Después, el medio se cambió a medio de hibridoma CD (Invitrogen) que es un medio sin suero, seguido de cultivo durante aproximadamente una semana. El anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante del cultivo resultante usando una columna de proteína G (GE Healthcare). Puesto que la tecnología de Velolmmune emplea ratones transgénicos en los que las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógenas se sustituyen con las regiones variables humanas correspondientes, el anticuerpo obtenido es un anticuerpo que tiene regiones variables del anticuerpo humano y regiones constantes del anticuerpo de ratón (también denominado como anticuerpo quimérico).

(Ejemplo 2: Ensayo ELISA)

25 Se usó un ensayo ELISA para medir la actividad de unión específica a antígeno de un anticuerpo. Para evaluar la selectividad de un PAI-1 humano activo, se llevaron a cabo ensayos usando una placa que se preparó inmovilizando vitronectina y añadiendo PAI-1 humano activo y una placa que se preparó añadiendo PAI-1 humano latente en lugar de PAI-1 humano activo.

30 Se diluyó vitronectina (BD Biosciences, 354238) en 1.000 ng/ml en tampón fosfato salino (PBS) y se añadió a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar la vitronectina. La solución de recubrimiento de vitronectina se retiró mediante centrifugación inversa y PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) o PAI-1 humano latente recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-L) diluidos a una concentración de 1.000 ng/ml en PBS se añadieron a 100 µl/pocillo, seguido de reposo a 4 °C durante 1 hora. Se retiró la solución mediante centrifugación inversa y una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) diluida 3 veces en PBS se añadió a 200 µl/pocillo. Después de reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, el agente bloqueante se retiró mediante centrifugación inversa. Las muestras de anticuerpo purificados se diluyeron en siete etapas en un intervalo de 1.000 ng/ml a 0,1 ng/ml para la placa a la que se había añadido PAI-1 humano activo y en un intervalo de 3.000 ng/ml a 0,3 ng/ml para la placa a la que se había añadido PAI-1 humano latente, usando solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) diluida 20 veces en PBS y, a continuación, se añadió a 100 µl/pocillo. Un pocillo al cual se había añadido una solución de agente bloqueante diluida 20 veces en PBS en lugar de un anticuerpo se preparó como control. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las placas se lavaron tres veces con una solución de lavado (solución salina tamponada con Tris (TBS) que contiene 0,05 % de Tween-20) y 100 µl de un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón marcado con HRP (DAKO P260) que se había diluido 2.000 veces con una solución de agente bloqueante diluida 20 veces en PBS se añadió a la misma. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron las placas tres veces con una solución de lavado. Se añadieron 100 µl de una solución de desarrollo de color contenida en un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, se añadieron 100 µl de una solución de detención de reacción contenida en el kit de desarrollo de color y, a continuación, se midió el valor de DO450 usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.).

55 En conexión con el cálculo de una tasa de unión de PAI-1 en cada concentración de cada anticuerpo, el valor de medición del pocillo al cual se añadió una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) diluida 20 veces en PBS en lugar de un anticuerpo se tomó como que es el 0 % y el valor máximo del valor de medición de cada anticuerpo se estableció al 100 %. La tasa de unión de PAI-1 calculada a partir del valor de medición se analizó para calcular los valores de CE50 de los anticuerpos mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

60 Como resultado, el anticuerpo designado HOT-1 (anticuerpo quimérico) se halló que tenía una actividad de unión superior selectivamente para el complejo de VTN-PAI-1 que para PAI-1 latente.

(Ejemplo 3: Producción de anticuerpo completamente humano)

65 El anticuerpo anteriormente mencionado es un anticuerpo en el que la región variable procede de humano y la región constante procede de ratón. Por consiguiente, los presentes inventores construyeron un vector de expresión

que comprendía tanto genes de la cadena pesada como de la cadena ligera usando un vector GS (Lonza, Inc.) que es un vector de expresión de célula de mamífero, preparando, de este modo, un anticuerpo completamente humano. Específicamente, con respecto a HOT-1 identificado en el Ejemplo 2, se extrajo ARN de la hibridoma y se preparó ADNc usando un kit de amplificación de ADNC (SMARTer RACE cDNA Amplification kit; Clontech). Después, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se alargaron y amplificaron usando una reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Un gen que codifica una secuencia de señal (Nigel Whittle et al., Protein Engineering, 1987, Vol. 1, N.º 6, pág. 499-505) se conectó al extremo 5' del gen de la región variable de la cadena pesada de HOT-1 y un gen de región constante de Igy1 humana (que consiste en la secuencia de bases de números base 355 a 1344 de la SEQ ID NO: 1) se conectó al extremo 3' del mismo y, a continuación, este gen de cadena pesada se insertó en un vector GS pEE6.4. Además, un gen que codifica una secuencia de señal (Nigel Whittle, et al., citado anteriormente) se conectó al extremo 5' del gen de región variable de la cadena ligera de HOT-1 y un gen de región constante de la cadena κ humano (que consiste en la secuencia de bases de números base 325 a 642 de la SEQ ID NO: 3) se conectó al extremo 3' del mismo y, a continuación, este gen de cadena ligera se insertó en un vector GS pEE12.4.

La secuencia de gen de cadena pesada de un anticuerpo insertado en pEE6.4 y la secuencia de gen de cadena ligera de un anticuerpo insertado en pEE12.4 se analizaron usando un secuenciador y, a partir de la secuencia de aminoácidos resultante, se determinaron las secuencias de CDR haciendo referencia a la base de datos de Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office).

La secuencia de bases de la cadena pesada del anticuerpo completamente humano preparado de HOT-1 (HOT-1 completamente humano) se indica en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 2, la secuencia de bases de la cadena ligera del anticuerpo se expone en la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases se expone en la SEQ ID NO: 4. La región variable de cadena pesada que se expone en la SEQ ID NO: 2 consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y la CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada cada una consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos número 31 a 35, 50 a 66 y 99 a 107 de la SEQ ID NO: 2. La región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 4 consiste en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera consisten cada una en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 24 a 34, 50 a 56 y 89 a 97 de la SEQ ID NO: 4.

El vector GS anteriormente descrito en el que se insertaron respectivamente los genes de la cadena pesada y la cadena ligera de HOT-1 completamente humano se escindió mediante enzimas de restricción *NotI* y *PvuI* y se sometió a ligamiento usando un Kit de ligamiento de ADN (Takara Bio Inc.), construyendo, de este modo, un vector GS en el que se insertaron ambos genes de la cadena pesada y la cadena ligera. La expresión de anticuerpos se llevó a cabo en dos modos de expresión transitoria y expresión constitutiva usando este vector GS. Para la expresión transitoria, se transfectó el vector GS en células FreeStyle 293 (Invitrogen) cultivadas a aproximadamente 1×10^6 células/ml en un medio de expresión de FreeStyle 293 (Invitrogen) usando un reactivo de transfección de FreestyleMAX (Invitrogen) y se cultivaron durante 7 días. El anticuerpo purificado del anticuerpo completamente humano se obtuvo a partir del sobrenadante del cultivo usando una columna de proteína G (GE Healthcare). Para la expresión constitutiva, se transfectó el vector GS en células CHO-K1SV (Lonza, Inc.) usando un método de electroporación, dando como resultado, de este modo, en la expresión de anticuerpos. El anticuerpo completamente humano se purificó a partir del sobrenadante del cultivo usando una columna de proteína A (GE Healthcare).

(Ejemplo 4: Análisis de modificaciones de aminoácidos de anticuerpo completamente humano)

Como resultado de analizar las modificaciones de aminoácidos del HOT-1 completamente humano purificado, se ha producido la eliminación de lisina en el C-terminal de la cadena pesada como en la mayoría de los anticuerpos purificados.

(Ejemplo 5: Medición de actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en plasma humano)

Para evaluar la actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en plasma humano para HOT-1 identificado en el Ejemplo 2 (anticuerpo quimérico) y HOT-1 completamente humano preparado en el Ejemplo 3, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de PAI-1 activo usando el plasma de pacientes obesos. En el caso de utilizar plasma humano normal, puesto que la concentración de PAI-1 activo es lenta y resulta complicado deconstruir un sistema de ensayo, se usó el plasma de pacientes obesos, por el cual es conocido que la concentración de PAI-1 activo en el plasma es alto, (Nature Medicine, 1996, Vol. 2, pág. 800-803).

uPA (unidades de urocinasa intravenosa 6×10^4 "Benesis (marca comercial registrada)"; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) se diluyó en 50 unidades/ml en PBS y se añade a 100 μ l/pocillo a una placa de ensayo de 96 pocillos blancos de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el uPA. Se retiró la solución de recubrimiento mediante centrifugación inversa y una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) diluida 3 veces en PBS se añadió a 200 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Mientras tanto, se preparó una mezcla de plasma de paciente obeso y muestra de anticuerpos (mezcla de plasma-anticuerpo). Específicamente, el plasma se diluyó usando PBS que contenía 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA), de modo que el plasma del paciente obeso se diluyó 35 veces cuando se preparó la mezcla de plasma-anticuerpo (la concentración de PAI-1 activo procedente de plasma humano contenido en la mezcla de plasma-anticuerpo es de aproximadamente 360 pg/ml). Además, la muestra de anticuerpo se diluyó en serie de dilución de siete etapas usando un 0,1 % de PBS que contenía BSA, de modo que la concentración final de un anticuerpo fue en un intervalo de 1.000 ng/ml a 1 ng/ml. Después, el plasma y la muestra de anticuerpo se mezclaron para preparar una mezcla de plasma-anticuerpo. Como muestra de curva de calibración, se preparó PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) que se había diluido en 7 etapas en un intervalo de 10.000 pg/ml a 10 pg/ml en 0,1 % de PBS que contenía BSA. Como muestra de control, se preparó una muestra en la que el plasma de paciente obeso se había mezclado con 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo. Estas mezclas de plasma-anticuerpo, muestra de curva de calibración y muestra de control se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se preincubaron.

Después de haber retirado el agente bloqueante en la placa de ensayo mediante centrifugación inversa, las mezclas de plasma-anticuerpo preincubadas, la muestra de curva de calibración y la muestra de control se añadieron a 100 µl/pocillo a la placa de ensayo que se dejó reposar, a continuación, a temperatura ambiente durante 30 minutos. La placa se lavó tres veces con una solución de lavado (TBS que contenía 0,05 % de Tween-20) y anticuerpos anti-PAI-1 (Progen Biotechnik, MA-33H1F7) diluidos 3.000 veces con una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se había diluido 20 veces en PBS se añadieron a la misma a 100 µl/pocillo. Después de dejarla reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado y anticuerpo anti-Ig de ratón biotinilados (Ansell, 234010) diluidos 2.000 veces con una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se había diluido 20 veces en PBS se añadieron a la misma a 100 µl/pocillo. Después de dejarla reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado y estreptavidina etiquetada con fosfatasa alcalina (Thermo Scientific) diluida 1.000 veces con una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se había diluido 20 veces en PBS se añadió a la misma a 100 µl/pocillo. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado. Un sustrato de fosfatasa alcalina (Chemiluminescent AP; SurModics, APU4-0100-01) diluida 5 veces en una solución acuosa de cloruro de magnesio de 0,1 mM que contenía 2 mM de Tris (pH 9,8) se añadió a 100 µl/pocillo y el valor de señal se midió usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.).

La concentración de PAI-1 humano activo se calculó utilizando una curva de calibración. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada anticuerpo y se calculó el valor promedio. La concentración de PAI-1 humano activo en el pocillo al cual se había añadido una muestra en la que se había mezclado PBS que contenía BSA al 0,1 % en lugar de un anticuerpo con el plasma de pacientes obesos se estableció al 100 % y la concentración de PAI-1 humano activo en el pocillo en el que se había mezclado 1.000 ng/ml del anticuerpo con el plasma de pacientes obesos se estableció al 0 %. La tasa inhibidora de PAI-1 humano activo calculada se analizó para calcular los valores de CI50 de los anticuerpos mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

Como resultado, se demostró que el valor de CI50 de HOT-1 (anticuerpo quimérico) es de 11,3 ng/ml y CI50 de HOT-1 completamente humano es de 6,0 ng/ml y ambos anticuerpos inhiben la actividad de unión a uPA de PAI-1 activo en plasma humano.

45 **(Ejemplo 6: Evaluación de selectividad de unión para complejo de VTN-PAI-1)**

Se usó un ensayo ELISA para evaluar la selectividad de unión de HOT-1 completamente humano preparado en el Ejemplo 3 para el complejo de VTN-PAI-1. Se prepararon cuatro plazas inmovilizadas de PAI-1 humano de los siguientes (1) a (4) y se llevaron a cabo los ensayos usando cada placa.

50 (1) Placa inmovilizada de complejo de VTN-PAI-1

Se diluyó vitronectina (BD Biosciences, 354238) en 1.000 ng/ml en PBS y se añadió a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar la vitronectina. La solución de recubrimiento se retiró mediante centrifugación inversa y se añadió un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) diluido a 1.000 ng/ml en 0,1 % de PBS que contiene BSA a 100 µl/pocillo y se deja capturar sobre la vitronectina. La actividad de unión del anticuerpo para VTN-PAI-1 se evaluó mediante el ensayo en esta placa.

60 (2) Placa inmovilizada de PAI-1 humano latente

Se diluyó PAI-1 humano latente recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-L) en 1.000 ng/ml de PBS y se añadió a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el PAI-1 humano latente. La solución de recubrimiento se retiró mediante centrifugación inversa y se añadió un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 µl/pocillo, seguido de

dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La actividad de unión del anticuerpo para PAI-1 humano latente se evaluó mediante el ensayo en esta placa.

(3) Placa inmovilizada de complejo de uPA-PAI-1

5 uPA (unidades de urocinasa intravenosa 6×10^4 "Benesis (marca comercial registrada)"; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) se diluyó en 100 unidades/ml en PBS y se añade a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el uPA. La solución de recubrimiento se retiró mediante centrifugación inversa y se añadió un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) diluido a 1.000 ng/ml en 0,1 % de PBS que contiene BSA a 100 μ l/pocillo y se deja capturar sobre el uPA. La actividad de unión del anticuerpo para el complejo de uPA-PAI-1 se evaluó mediante el ensayo en esta placa.

15 (4) Placa inmovilizada de complejo de tPA-PAI-1

tPA (marca comercial registrada) para inyección 6.000.000; Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) a 1.000 unidades/ml en PBS y se añadió a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos clara de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el tPA. La solución de recubrimiento se retiró mediante centrifugación inversa y se añadió un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) diluido a 1.000 ng/ml en 0,1 % de PBS que contiene BSA a 100 μ l/pocillo y se deja capturar sobre el tPA. La actividad de unión del anticuerpo para el complejo de tPA-PAI-1 se evaluó mediante el ensayo en esta placa.

25 Cada una de las placas inmovilizadas de PAI-1 humano preparadas se lavó con una solución de lavado (TBS que contenía 0,05 % de Tween-20) y HOT-1 completamente humano, que se había diluido en ocho etapas en un intervalo de 100.000 ng/ml a 0,01 ng/ml con 0,1 % de PBS que contiene BSA, se añadió a 100 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como anticuerpos comparativos, MEDI-579 (Documento de patente 3) que es un anticuerpo anti-PAI-1 humano completamente humano y MA-33B8 (Progen Biotechnik Ltd.), MA-33H1F7 (Progen Biotechnik, Inc.), MA-55F4C12 (Hycult Biotech Inc., HM2180) y MA-56A7C10 (Hycult Biotech Inc., HM2182) que son anticuerpo anti-PAI-1 humano de ratón se diluyeron en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml usando PBS que contenía BSA al 0,1 % y, a continuación, se añadieron a 100 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como control, se preparó un pocillo al cual se había añadido 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo. Después de lavarlo tres veces con una solución de lavado, se añade un anticuerpo de detección diluido 2.000 veces usando una solución de agente de bloqueo (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se había diluido 20 veces en PBS se añadió a 100 μ l/pocillo, seguido por la reacción. Un anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón etiquetado con HRP (Southern Biotech, 1010-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región Fc de un anticuerpo de ratón y un anticuerpo de conejo anti-Ig humano etiquetado con HRP (Southern Biotech, 6145-05) para la detección de un anticuerpo de ensayo que tiene una región de Fc de un anticuerpo humano se usan como el anticuerpo de detección. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron las placas tres veces con una solución de lavado. Una solución de desarrollo de color contenida en un kit de desarrollo de color de peroxidasa (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se añadió a 100 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, se añadieron 100 μ l de una solución de detención de reacción contenida en el kit de desarrollo de color y, a continuación, se midió el valor de DO450 usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.).

50 Para cada placa, se llevó a cabo el ensayo de cada anticuerpo por duplicado y se calculó el valor promedio. En conexión con el cálculo de una tasa de unión de PAI-1 en cada concentración de cada anticuerpo, el valor de medición de un pocillo al que se había agregado 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo de ensayo se tomó para que fuera el 0 % y el valor de medición de la concentración máxima en cada anticuerpo se estableció al 100 %. Mientras tanto, con respecto a HOT-1 completamente humano, el sistema de evaluación de actividad de unión para PAI-1 humano latente, el complejo de uPA-PAI-1 y el complejo de tPA-PAI-1, el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en cada sistema de evaluación se estableció al 100 % cuando se añadió HOT-1 completamente humano a la concentración máxima pero el valor de medición no alcanzó el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 que tenía la misma región de Fc humana. Con respecto a MA33-B8, en el sistema de evaluación de actividad de unión para el complejo de VTN-PAI-1, el valor de medición de la concentración máxima en el sistema de evaluación de MA56-A7C10 se estableció al 100 % puesto que no alcanzó el valor de medición de la concentración máxima de MA56-A7C10 que tenía la misma región de Fc de ratón incluso cuando se agregó la concentración máxima. La tasa de unión de PAI-1 calculada se analizó para calcular los valores de CE50 de los anticuerpos mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

65 Tabla 1: Actividad de unión de anticuerpo anti-PAI-1 humano para varios PAI-1 humano

[Tabla 1]

	valor de CE50 (ng/ml)			
	VTN-PAI-1	PAI-1 humano latente	uPA-PAI-1 humano	tPA-PAI-1 humano
HOT-1 completamente humano	4,2	88801	>100000	>100000
MEDI-579	5,2	22,1	6,1	3,2
MA33-H1F7	14,3	13,6	12,7	11,7
MA33-B8	5685	639,8	12,9	22,8
MA55-F4C12	7,5	12,8	9,8	9,2
MA56-A7C10	23,9	29,9	16,0	12,7

> 100.000 se refiere a que la concentración de anticuerpos que muestra el 50 % del valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en cada sistema de evaluación es superior a 100.000 ng/ml.

Como resultado, se demostró que HOT-1 completamente humano muestra una fuerte actividad para el complejo de VTN-PAI-1 y también tiene una muy alta actividad de unión selectiva.

- 5 Puesto que el HOT-1 completamente humano tiene una muy alta actividad de unión selectiva para el complejo de VTN-PAI-1 en comparación con cada anticuerpo comparativo, se ha sugerido que el HOT-1 completamente humano tiene un sitio de unión a PAI-1 distinto de los convencionalmente conocidos anticuerpo anti-PAI-1 humano y, por lo tanto, se une al centro activo de PAI-1 humano o un sitio más cercano a este.

10 (Ejemplo 7: Evaluación de unión a PAI-1 humano activo monomérico)

Para medir la actividad de unión de HOT-1 completamente humano con respecto a PAI-1 humano activo monomérico, se llevó a cabo un análisis de SPR. En el análisis de SPR, el análisis se llevó a cabo usando Biacore (marca comercial registrada) T200 (GE Healthcare Japan) y PAI-1 humana activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A). Como resultado, se demostró que HOT-1 completamente humano se une a PAI-1 humano activo que está presente como un monómero.

(Ejemplo 8: Evaluación de selectividad de unión para PAI-1 de mono)

- 20 Se usó un ensayo ELISA para evaluar la selectividad de unión de HOT-1 completamente humano para PAI-1 de mono activo que forma complejo con vitronectina (también denominado como complejo de VTN-PAI-1 de mono). Se prepararon cuatro plazas inmovilizadas de PAI-1 de mono de los siguientes (1) a (4) y se llevaron a cabo los ensayo usando cada placa. se usó MEDI-579 como anticuerpo comparativo.

- 25 (1) Placa inmovilizada de complejo de VTN-PAI-1 de mono

La actividad de unión del anticuerpo para VTN-PAI-1 de mono se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6 (1). Mientras tanto, se usó PAI-1 de mono activo recombinante (Molecular Innovations Inc., CYPAL) en lugar de PAI-1 humano activo recombinante. Además, se diluyeron HOT-1 completamente humano y MEDI-579 en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml y, a continuación, se usaron.

- (2) Placa inmovilizada de PAI-1 de mono latente

La actividad de unión del anticuerpo para PAI-1 de mono latente se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6 (2). Mientras tanto, se usó PAI-1 de mono latente recombinante (Molecular Innovations Inc., CYPAL-L) en lugar de PAI-1 humano latente recombinante. Además, se diluyeron HOT-1 completamente humano y MEDI-579 en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml y, a continuación, se usaron.

- (3) Placa inmovilizada de complejo de uPA-PAI-1 de mono

La actividad de unión del anticuerpo para el complejo de uPA-PAI-1 de mono se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6 (3). Mientras tanto, se usó PAI-1 de mono activo recombinante (Molecular Innovations Inc., CYPAL) en lugar de PAI-1 humano activo recombinante. Además, se diluyeron HOT-1 completamente humano y MEDI-579 en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml y, a continuación, se usaron.

- (4) Placa inmovilizada de complejo de tPA-PAI-1 de mono

La actividad de unión del anticuerpo para el complejo de tPA-PAI-1 de mono se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6 (4). Mientras tanto, se usó PAI-1 de mono activo recombinante (Molecular Innovations Inc., CYPAL) en lugar de PAI-1 humano activo recombinante. Además, se diluyeron HOT-1 completamente humano y MEDI-579 en siete etapas en un intervalo de 10.000 ng/ml a 0,01 ng/ml y, a continuación, se usaron.

Usando cada una de las placas inmobilizadas de PAI-1 de mono preparadas, se calculó un valor de CE50 de cada anticuerpo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6. Mientras tanto, con respecto a HOT-1 completamente humano, el sistema de evaluación de actividad de unión para PAI-1 de mono latente, el complejo de uPA-PAI-1 de mono y el complejo de tPA-PAI-1 de mono, el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en cada sistema de evaluación se estableció al 100 % cuando se añadió HOT-1 completamente humano a la concentración máxima pero el valor de medición no alcanzó el valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 que tenía la misma región de Fc humana.

Tabla 2: Actividad de unión de anticuerpo anti-PAI-1 para varios PAI-1 de mono

[Tabla 2]

	valor de CE50 (ng/ml)			
	VTN-PAI-1 de mono	PAI-1 de mono latente	uPA-PAI-1 de mono	tPA-PAI-1 de mono
HOT-1 completamente humano	3,6	>10000	>10000	>10000
MEDI-579	4,1	48,2	5,4	4,3

> 10.000 se refiere a que la concentración de anticuerpos que muestra el 50 % del valor de medición de la concentración máxima de MEDI-579 en cada sistema de evaluación es superior a 10.000 ng/ml.

Como resultado, se demostró que el anticuerpo de HOT-1 completamente humano muestra una fuerte actividad de unión para el complejo de VTN-PAI-1 de mono y también tiene una muy alta actividad de unión selectiva.

(Ejemplo 9: Medición de actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en plasma humano y de mono)

Se llevó a cabo la evaluación de una actividad inhibidora de HOT-1 completamente humano y MEDI-579 en PAI-1 humano en plasma humano de y de mono. Con respecto al plasma humano, se usó el plasma de pacientes obesos de la misma manera que en el Ejemplo 5. Con respecto al plasma de mono, se usó plasma recogido de monos cinomólogos con la administración de LPS.

La evaluación de una actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en plasma humano se llevó a cabo de acuerdo con el método del Ejemplo 5. La evaluación de una actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en plasma de mono se llevó a cabo usando plasma de mono en lugar de plasma humano en el método descrito en el Ejemplo 5. Con respecto al plasma de mono, el plasma se diluyó usando 0,1 % de PBS que contiene BSA, de modo que el plasma de mono se diluyó 120 veces cuando se preparó una mezcla de plasma-anticuerpo. Para ambos sistemas de evaluación, la concentración final de cada anticuerpo se usó en un intervalo de 300 ng/ml a 0,3 ng/ml (dilución de 7 etapas). Como muestra de curva de calibración, se usó preparó PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) que se había diluido en 7 etapas en un intervalo de 3000 pg/ml a 3 pg/ml con 0,1 % de PBS que contenía BSA.

La concentración de cada PAI-1 activo se calculó utilizando una curva de calibración. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada anticuerpo y se calculó el valor promedio. La concentración de PAI-1 activo en el pocillo al cual se había añadido una muestra en la que se había mezclado PBS que contenía BSA al 0,1 % en lugar de un anticuerpo con el plasma de pacientes obesos o plasma de monos se estableció al 100 % y la concentración de cada PAI-1 activo en el pocillo en el que se había mezclado 300 ng/ml de un anticuerpo MEDI-579 con el plasma de pacientes obesos o plasma de mono se estableció al 0 %. Cada una de las tasas inhibidoras de PAI-1 activo calculadas se analizó para calcular los valores de CI50 de los anticuerpos mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros.

Como resultado, el valor de la CI50 de HOT-1 completamente humano fue de 4,2 ng/ml y el valor de la CI50 de MEDI-579 fue de 0,73 ng/ml, para la actividad de unión de uPA del PAI-1 activo en plasma humano. Con respecto a la actividad de unión de uPA del PAI-1 activo en plasma de mono, el valor de la CI50 de HOT-1 completamente humano fue de 37 ng/ml y el valor de la CI50 de MEDI-579 fue de 0,83 ng/ml.

Se demostró que HOT-1 completamente humano y MEDI-579 inhiben la actividad de unión de uPA de PAI-1 activo en plasma humano y de mono.

(Ejemplo 10: Medición de actividad inhibidora de PAI-1 en sistema de reproducción intravascular *in vitro*)

Se sabe que uPA y tPA en las paredes de los vasos sanguíneos se producen a partir de endotelio vascular y se unen al endotelio vascular (Baillieres Clin. Haematol., 1993, Vol. 6, N.º 3, pág. 559-576. Blood, 2011, Vol. 118, N.º 11, pág. 3182-3185). En otras palabras, el uPA y tPA están presentes en las paredes de los vasos sanguíneos así como en la sangre. En el ejemplo 9, se midió la actividad inhibidora de un anticuerpo anti-PAI-1 sobre PAI-1 activo en el plasma, pero este sistema experimental no tuvo en consideración la influencia de las paredes de los vasos

sanguíneos en el hecho de que solo se extraen los componentes en el plasma. Por lo tanto, es complicado considerar tal sistema experimental como que refleje las reacciones biológicas reales en los vasos sanguíneos. Por este motivo, el uso de un sistema de evaluación en el que PAI-1 activo, péptidos de sustrato de uPA y uPA se mezclaron en una placa de ensayo sobre la cual se había inmovilizado un complejo de uPA-PAI-1 como un sistema que imita el estado intravascular real, las actividades de HOT-1 completamente humano y MEDI-579 se midieron tomando la actividad de uPA como indicador.

Se diluyó PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) en 10 µg/ml de PBS y se añadió a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos blanca de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, a temperatura ambiente durante 20 minutos para inmovilizar el PAI-1 activo. Se retiró la solución de recubrimiento mediante centrifugación inversa y una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) se añadió a 200 µl/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de retirar la solución mediante centrifugación inversa, uPA (unidades de urocinasa intravenosa 6×10^4 "Benesis (marca comercial registrada)"; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) se diluyó a 50 unidades/ml con un agente bloqueante que se había diluido 3 veces en PBS y, a continuación, se añadió a 100 µl/pocillo. Después de dejarla reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, tampón de bicarbonato (Sigma-Aldrich Co., LLC., C3041-50CAP) se añadió a 200 µl/pocillo, seguido por dejar reposar durante a la noche a 37 °C.

El uso de un 0,1 % de PBS que contiene BSA, cada anticuerpo se diluyó en una serie de dilución de 10 etapas a la concentración final en un intervalo de 500 ng/ml a 0,015 ng/ml. Cada solución de anticuerpo se mezcló con PAI-1 humano activo recombinante a una concentración final de 0,0025 µg/ml en PBS, vitronectina diluida a una concentración final de 0,0025 µg/ml en PBS, Glutarilglicil-L-arginina 4-metilcoumaril-7-amida (Peptide Institute, 3097-v), que es un péptido de sustrato de uPA, diluido a una concentración final de 65 ng/ml en PBS, BSA diluido a una concentración final de 1,25 mg/ml en PBS y uPA diluido a una concentración final de 0,05 unidades/ml en PBS. Como control, se preparó un pocillo al que se había añadido PBS que contiene BSA al 0,1 % en lugar de un anticuerpo y un pocillo al que se había mezclado PBS y PBS que contiene BSA al 0,1 % en lugar de un anticuerpo y PAI-1 humano activo recombinante.

Después de que la placa se lavara tres veces con una solución de lavado (TBS que contiene 0,05 % de Tween-20), se añadió la anterior mezcla a 50 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas para dar como resultado la progresión de una reacción enzimática en la que uPA escinde un péptido de sustrato. Cuando el péptido de sustrato se escinde, se separa una sustancia fluorescente de 7-amino-4-metil-cumarina del péptido mismo. Se recogió una muestra de cada pocillo a 20 µl/pocillo y se transfirió a una placa de 384 pocillos negra de Nunc (Nunc, Inc.), y se midieron los valores de señal fluorescente a una longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 505 nm usando un contador de EnVision (PerkinElmer Co., Ltd.).

Se llevó a cabo el ensayo de cada anticuerpo por duplicado y se calculó el valor promedio. En conexión con el cálculo de una tasa de unión de la tasa de actividad de uPA en cada concentración de cada anticuerpo, el valor promedio de los valores de medición del pocillo al que se había añadido PBS que contenía BSA al 0,1 % en lugar de un anticuerpo se tomaron como que eran del 0 % y el valor promedio de los valores de medición del pocillo al que se había añadido PBS y PBS que contenía BSA al 0,1 % en lugar de un anticuerpo y PAI-1 humano activo recombinante se estableció al 100 %. La tasa de actividad de uPA calculada se analizó para calcular los valores de CE50 de los anticuerpos mediante regresión de curva logística de cuatro parámetros. Puesto que PAI-1 inhibe la actividad de uPA, la actividad de uPA se vuelve superior según la actividad inhibitoria de PAI-1 humano del anticuerpo se vuelve superior.

Como resultado, un valor de la CE50 de HOT-1 completamente humano fue de 12,7 ng/ml y el valor de la CE50 de MEDI-579 fue de 42,1 ng/ml, tomando la actividad de uPA en este sistema de evaluación como un indicador. Se demostró que HOT-1 completamente humano tenía una capacidad de activación de uPA superior. Por consiguiente, en este sistema de evaluación, se demostró que HOT-1 completamente humano tenía una actividad inhibitoria de PAI-1 superior.

(Ejemplo 11: Medición de concentración de anticuerpos en plasma de mono)

A partir de los resultados del Ejemplo 6, se demostró que HOT-1 completamente humano muestra una fuerte actividad para el complejo de VTN-PAI-1 y también tiene una muy alta actividad de unión selectiva. Generalmente, se sabe que un anticuerpo en la sangre se une a un antígeno y que, a continuación, se metaboliza como un complejo antígeno-anticuerpo, además de eso, el anticuerpo puede metabolizarse directamente (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, Vol. 101, N.º 12, págs. 4367-4382). Puesto que PAI-1 en el plasma está presente en la forma de PAI-1 latente y diversos complejos tales como complejos de tPA-PAI-1 además de VTN-PAI-1 (Blood, 1990, Vol. 76, pág. 930-937) y un anticuerpo anti-PAI-1 que tiene baja selectividad forma un complejo de antígeno-anticuerpo con diversos PAI-1 y, a continuación, se metaboliza. Por otro lado, HOT-1 completamente humano se une a VTN-PAI-1 y, de este modo, se metaboliza difícilmente como un complejo con PAI-1 latente o PA-PAI-1 y, por consiguiente, hay una posibilidad considerada de duración a largo plazo de la concentración de HOT-1 completamente humano en la sangre. De hecho, se sabe que la duración de concentración en sangre de anticuerpo depende en gran medida de la tasa metabólica de este complejo de antígeno-anticuerpo (Bioanalysis, 2011, Vol. 3,

N.º 6, pág. 659-675). A partir de los resultados del Ejemplo 8, puesto que HOT-1 completamente humano mostró una alta actividad de unión selectiva para el complejo de PAI-1 de VTN de mono, se determinó la concentración de anticuerpos en el plasma cuando se administra el anticuerpo a monos. Se usó MEDI-579 como anticuerpo comparativo.

5 Se administraron por vía intravenosa un HOT-1 completamente humano o MEDI-579 diluido en PBS a monos cinomólgos. Los grupos tratados se establecieron del siguiente modo.

[Grupos tratados]

10 Grupo administrado con HOT-1 (n = 3):
 Un grupo al que se le administró HOT-1 completamente humano (2,0 mg/kg)
 Grupo administrado con MEDI-579 (n = 2):
 Un grupo al que se administró MEDI-579 (2,0 mg/kg)
 15 Se recogió sangre antes de la administración de anticuerpo y a 0,25, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 336 y 504 horas después de la administración de anticuerpo para obtener el plasma. Con respecto a HOT-1 completamente humano, se recogió adicionalmente sangre después de 672, 936, 1200 y 1440 horas para obtener el plasma.

20 La concentración de cada anticuerpo en el plasma se midió mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL).

El ensayo de ECL de HOT-1 completamente humano se muestra a continuación. Se diluyó vitronectina a 100 ng/ml en TBS y se añadió a 25 µl/pocillo usando una placa de 96 pocillos de multimatriz (Meso Scale Discovery, L15XA-1). La placa se dejó reposar durante la noche a 4 °C para inmovilizar vitronectina sobre la placa. La solución de recubrimiento de vitronectina se retiró mediante centrifugación inversa y se lavó la placa tres veces con un líquido de lavado (TBS que contenía 0,05 % de Tween-20). Se añadió a 25 µl/pocillo PAI-1 humano activo recombinante (Molecular Innovations Inc., PAI-A) diluido a 100 ng/ml en TBS, seguido de reposo a 4 °C durante 1 hora para dar como resultado la inmovilización. La solución de recubrimiento se retiró mediante centrifugación inversa, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado y se añadió un agente bloqueante 1 (Thermo Scientific, 37532) a 150 µl.
 30 Después de dejarla reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, el agente bloqueante 1 se retiró mediante centrifugación inversa y se lavó la placa tres veces con una solución de lavado. El plasma de monos a los que se había administrado un anticuerpo se diluyó 100 veces en una solución de agente bloqueante 1 que contenía 0,05 % de Tween-20, se diluyó adicionalmente para que se encontrara dentro del intervalo de una curva de calibración, usando una solución de agente bloqueante 1 que contiene 0,05 % de Tween-20 que contiene 1 % de plasma de monos al que no se había administrado un anticuerpo (en lo sucesivo, denominado como una solución de agente bloqueante 1 que contiene plasma-Tween) y, a continuación, se añadió a 25 µl/pocillo. Para la preparación de una curva de curva de calibración, se preparó un pocillo al que se había añadido el HOT-1 completamente humano diluido en 11 etapas en un intervalo de 100 ng/ml a 0,0017 ng/ml usando la solución de agente bloqueante 1 que contiene plasma-Tween. Como control, se preparó un pocillo al cual se había añadido la solución de agente bloqueante 1 que contenía plasma-Tween en lugar de un anticuerpo. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución se retiró mediante centrifugación inversa, después de lavarlo tres veces con una solución de lavado. 25 µl de biotina de cadena ligera de inmunoglobulina de mono de anti-IgG humano absorbida (Immuno-Biological Laboratories, 17249) diluida a 80 ng/ml usando una solución de agente bloqueante 1 que contenía 0,05 % de Tween-20 se añadió a la misma. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución se retiró mediante centrifugación inversa, después de lavarlo tres veces con una solución de lavado. 25 µl de Estreptavidina MSD SULFO-TAG (Meso Scale Discovery, R32AD-1) diluida a 20 ng/ml usando una solución de agente bloqueante 1 que contenía 0,05 % de Tween-20 se añadió a la misma. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución se retiró mediante centrifugación inversa, después de lavarlo tres veces con una solución de lavado. se añadieron 150 µl de tampón de lectura de MSD T(4x) con tensioactivo (Meso Scale Discovery, R92TC-2) diluido 2 veces en agua ultrapura (MilliQ (marca comercial registrada), Merck KGaA) y se midió la electroquimioluminiscencia usando un formador de imágenes SECTOR 6000 (Meso Scale Discovery).

La concentración de MEDI-579 en el plasma se midió de acuerdo con el método de ensayo de ECL de HOT-1 completamente humano. Mientras tanto, vitronectina y PAI-1 humano activo recombinante se usaron a una concentración de 75 ng/ml. Como una etapa bloqueante después de la inmovilización de PAI-1 activo recombinante, se llevó a cabo el siguiente tratamiento de bloque en lugar del tratamiento con el agente bloqueante 1. Un agente bloqueante 2 (Meso Scale Discovery, R93BA-1) disuelto a 5 % p/v se añadió a 150 µl/pocillo y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. El agente bloqueante se retiró, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado y, a continuación, un agente bloqueante 3 (Meso Scale Discovery, R51BB-3) que se había diluido 4 veces en el agente bloqueante 1 se añadió a 50 µl/pocillo.

En el cálculo de la concentración de anticuerpos, se preparó una curva de calibración. El análisis de la ecuación de regresión se llevó a cabo en un modelo logístico de cinco parámetros. La ponderación fue de $1/y^2$. La concentración de anticuerpos en cada punto de recogida de sangre se calculó a partir de la curva de calibración. El ensayo de cada plasma se llevó a cabo por triplicado y para obtener un valor promedio de las concentraciones calculadas. Las concentraciones de anticuerpos resultantes se analizaron para cada material de ensayo y cada mono de ensayo

usando un BioBook (IDBS, Inc.). La semivida del anticuerpo se calculó a partir de la pendiente de la fase β de un gráfico que ilustra el eje vertical como un valor logarítmico de la concentración de anticuerpos y el eje horizontal como un tiempo de recogida de sangre.

- 5 Como resultado, la semivida de MEDI-579 fue de 52,6 horas mientras que la semivida de HOT-1 completamente humano fue de 255 horas. Se demostró que HOT-1 completamente humano tenía una duración más prolongada en la sangre.

10 **(Ejemplo 12: Medición de actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en sangre de mono)**

La duración y fuerte inhibición de la actividad del PAI-1 en la sangre de monos es deseable para la prevención o tratamiento de una enfermedad en la que el PAI-1 está implicado en la patogénesis de la misma, tal como fibrosis pulmonar. Por consiguiente, se evaluó la actividad inhibidora de HOT-1 completamente humano sobre PAI-1 activo en sangre de mono. Se usó MEDI-579 como anticuerpo comparativo.

15 La actividad inhibidora sobre PAI-1 activo en la sangre se midió usando el plasma obtenido a partir de monos dosificados con HOT-1 completamente humano o MEDI-579 en el Ejemplo 11.

20 uPA (unidades de urocinasa intravenosa 6×10^4 "Benesis (marca comercial registrada)"; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation) se diluyó en 50 unidades/ml en PBS y se añade a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos blanca de Nunc MaxiSorp (Nunc Inc.) que se dejó reposar, a continuación, durante la noche a 4 °C para inmovilizar el uPA. La solución de recubrimiento se retiró mediante centrifugación inversa y se añadió un agente bloqueante (Thermo Scientific, 37532) a 200 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con una solución de lavado (TBS que contenía 0,05 % de Tween-20) y el plasma diluido 10 veces en PBS que contenía 0,1 % de BSA se añadió a 100 μ l/pocillo, seguido de dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para una curva de calibración, se diluyó PAI-1 humano activo (Molecular Innovations Inc., PAI-A) en siete etapas en un intervalo de 300 ng/ml a 0,003 ng/ml usando 0,1 % de PBS que contenía BSA, se añadió a 100 μ l/pocillo y se dejó reposar simultáneamente con el plasma a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como control, se preparó un pocillo al cual se había añadido 0,1 % de PBS que contenía BSA en lugar de un anticuerpo. La placa se lavó tres veces con una solución de lavado y se biotiniló (Dojindo Molecular Technologies, Inc., LK03) anticuerpo anti-PAI-1 (Progen Biotechnik, MA-33H1F7) se diluyó 10.000 veces usando una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se había diluido 20 veces en PBS se añadió a 100 μ l/pocillo, seguido por la reacción. En este caso, a partir de los resultados del Ejemplo 6, se usó MA-33H1F7 como un anticuerpo anti-PAI-1 el cual reconoce el complejo uPA-PAI-1 sobre la placa. La biotinilación se llevó a cabo según el método que se instruye en el kit de Dojindo Molecular Technologies, Inc. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado y estreptavidina-AL (Thermo Scientific, 21324) diluida 1000 veces usando una solución de agente bloqueante (NACALAI TESQUE, INC., 03953-95) que se había diluido 20 veces en PBS se añadió a 100 μ l. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lavó tres veces con una solución de lavado y un sustrato de fosfatasa alcalina (Chemiluminescent AP; SurModics, APU4-0100-01) diluido 5 veces en una solución acuosa de cloruro de magnesio que de 0,1 mM que contenía 2 mM de Tris (pH 9,8) se añadió a 100 μ l/pocillo. Después de dejarla reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, el valor de señal se midió usando un contador de EnVision (PerkinELmer Co., Ltd.).

45 La concentración de PAI-1 activo se calculó utilizando una curva de calibración. Los resultados de un efecto inhibidor de cada anticuerpo sobre PAI-1 en plasma de mono se muestran en la Fig. 1. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada plasma y se calculó el valor promedio. Además, se ponderaron los valores de plasma de mono de cada grupo usado en el ensayo. La concentración de PAI-1 activo antes de la administración de anticuerpo se tomó como que era del 100 % y la concentración de PAI-1 activo de 0 ng/ml para la curva de calibración se tomó como que era del 0 % para calcular una tasa inhibidora de la concentración de PAI-1 activo en cada plasma y el número de día que puede inhibir el 50 % o más de la concentración de PAI-1 activo en el plasma antes de la administración de anticuerpo con respecto antes de que se calculara la administración de anticuerpos.

55 Como resultado, el número de días que puede inhibir el 50 % o más de la concentración de PAI-1 activo en el plasma fue de 28 días en el grupo al que se administró HOT-1 completamente humano y de 7 días en el grupo al que se administró MEDI-579. Se demostró que HOT-1 completamente humano muestra una duración e inhibición más fuerte de PAI-1 activo en el plasma, cuando se comparó con MEDI-579.

60 **Aplicabilidad industrial**

Los anticuerpos anti-PAI-1 humanos de la presente invención son útiles para la prevención o tratamiento de diversas enfermedades en las que el PAI-1 humano activo está implicado en la patogénesis de las mismas. Además, polinucleótidos, vectores de expresión, células hospedadoras transformadas y métodos de producción de anticuerpos de la presente invención son útiles para la producción de los anticuerpos anti-PAI-1 humanos anteriormente mencionados.

[Texto libre de listado de secuencias]

En el encabezado de número <223> del listado de secuencias, se hace descripción de "Secuencia artificial". Específicamente, la secuencia de bases de la SEQ ID NOS: 1 y 3 del listado de secuencias son las secuencias de bases de la cadena pesada y la cadena ligera de HOT-1 completamente humano, respectivamente y las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NOS: 2 y 4 son las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera codificadas en la SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente.

Listado de secuencias

- 10 <110> Astellas Pharma Inc.
- <120> Nuevo anticuerpo anti-PAI-1 humano
- 15 <130> A15003A00
- <150> JP2014-031319
- <151> 21/02/2014
- 20 <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 1347
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Gen de cadena H de anticuerpo anti-PAI-1 humano
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1347)
- 35 <400> 1

ES 2 726 915 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggt	gtg	gta	cgg	cct	ggg	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	gat	gat	cat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	His	
			20					25					30			
ggc	atg	acc	tgg	gtc	cgc	caa	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtc	144
Gly	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
tct	ggt	att	aat	tgg	aat	ggt	gct	aga	aca	ggt	tat	gca	gac	tct	gtg	192
Ser	Gly	Ile	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Arg	Thr	Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	tcc	ctc	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	cac	ctg	atc	agt	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gcc	ttg	tat	cac	tgt	288
Leu	His	Leu	Ile	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	His	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	cgg	gga	ctg	ggc	ctc	ttt	gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	acc	336
Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Leu	Gly	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	384
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115				120						125			
ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	432
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	

ES 2 726 915 T3

130		135		140		
tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac						480
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn						
145		150		155		160
tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag						528
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln						
		165		170		175
tcc tca gga ctc tac tcc ctt agt agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc						576
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser						
		180		185		190
agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc						624
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser						
		195		200		205
aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act						672
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr						
		210		215		220
cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca						720
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser						
		225		230		235
gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg						768
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg						
		245		250		255
acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct						816
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro						
		260		265		270
gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc						864
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala						
		275		280		285
aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc						912
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val						
		290		295		300
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac						960
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr						
		305		310		315
aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc						1008
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr						
		325		330		335
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg						1056
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu						
		340		345		350
ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc						1104
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys						
		355		360		365
ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc						1152
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser						
		370		375		380
aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac						1200

ES 2 726 915 T3

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

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc 1248
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct 1296
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1344
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

tga 1347

<210> 2
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp His
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Ala Arg Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Arg Gly Leu Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

ES 2 726 915 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 726 915 T3

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

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

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

<210> 3
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena L de anticuerpo anti-PAI-1 humano

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

<400> 3

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gtc cct aag atc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

tat aag gcg tct aga ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg atc agc ggc 192
 Tyr Lys Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat ggt tat tcg tac 288
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Ser Tyr
 85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt acg gtg gct gca 336
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 384
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 432
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

ES 2 726 915 T3

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 480
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctg agc 528
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 576
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 624
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

ttc aac agg gga gag tgt tag 645
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Gly Tyr Ser Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

ES 2 726 915 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile
 1 5 10 15

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 5 una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 31 a 35 de la SEQ ID NO: 2, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 50 a 66 de la SEQ ID NO: 2 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 99 a 107 de la SEQ ID: 2; y
- 10 una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 24 a 34 de la SEQ ID NO: 4, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 50 a 56 de la SEQ ID NO: 4 y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 89 a 97 de la SEQ ID: 4.
2. El anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de cualquiera uno de los siguientes (1) y (2):
- 15 (1) un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 118 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 108 de la SEQ ID: 4; y
- 20 (2) un anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo, en el cual el ácido glutámico en el extremo N de la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo está modificado a ácido piroglutámico.
3. El anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2, que se selecciona de cualquiera uno de los siguientes (1) y (2):
- 25 (1) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; y
- 30 (2) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en la cual el ácido glutámico del aminoácido número 1 está modificado a ácido piroglutámico y/o la lisina del aminoácido número 448 está eliminada en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4.
- 35 4. El anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.
- 40 5. El anticuerpo anti-PAI-I humano de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.
6. Un polinucleótido que comprende:
- 45 (1) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y
- 50 (2) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2.
7. Un polinucleótido que comprende:
- 55 (1) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y
- (2) un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4.
8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2.
- 60 9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y un polinucleótido que
- 65

comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4.

5 10. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, que se selecciona entre el grupo que consiste en el siguiente (a) a (b):

10 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; y

15 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

20 11. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, que se selecciona entre el grupo que consiste en el siguiente (a) a (b):

20 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo; y

25 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

30 12. Un método de producción de un anticuerpo anti-PAI-1 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en el siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo:

35 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo;

40 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; y

45 (c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

50 13. Un método de producción de un anticuerpo anti-PAI-1 humano, que comprende cultivar célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en el siguiente (a) a (c) para expresar el anticuerpo anti-PAI-1 humano:

55 (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo;

60 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo; y

65 (c) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena pesada del anticuerpo anti-PAI-1 humano de acuerdo con la reivindicación 4 y una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de bases que codifica la cadena ligera del anticuerpo anti-PAI-1 humano.

14. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y:

- 5 (1) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; y/o
- (2) un anticuerpo anti-PAI-1 humano que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos números 1 a 447 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

FIG. 1

