

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-532399

(P2009-532399A)

(43) 公表日 平成21年9月10日(2009.9.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02	
<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00 1 O 1	
	A 6 1 K 39/395 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-503466 (P2009-503466)  
 (86) (22) 出願日 平成19年4月2日(2007.4.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月2日(2008.12.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/002929  
 (87) 国際公開番号 W02007/115713  
 (87) 国際公開日 平成19年10月18日(2007.10.18)  
 (31) 優先権主張番号 102006015341.3  
 (32) 優先日 平成18年4月3日(2006.4.3)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(71) 出願人 508298363  
 ゲオルク-アウグスト-ユニヴェルジテ  
 ト・ゲッティンゲン・シュティフトゥング  
 ・エッフエントリヒェン・レヒツ  
 Georg-August-Univers  
 sitaet Goettingen S  
 tiftung oeffentlich  
 en Rechts  
 ドイツ連邦共和国デー-37099ゲッテ  
 インゲン、ロベルト-コッホ-シュトラ-  
 セ42番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多発性硬化症および／または関節リウマチの処置

(57) 【要約】

本発明は、好ましくは霊長類またはヒトである患者の多発性硬化症および／または関節リウマチの処置に有用な医薬を製造するための、ケモカイン受容体CCR2と特異的に結合できる抗体の使用に関する。別の実施形態において、本発明は、多発性硬化症および／または関節リウマチ罹患患者において単球を枯渇させるために有用な医薬を製造するための、ケモカイン受容体CCR2と特異的に結合できる抗体の使用に関する。本発明は、さらに、対応するインビトロの方法および治療方法に関する。CCR2に結合できる抗体に加えて、CD14に結合できる抗体を使用出来る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象における多発性硬化症および/または関節リュウマチの処置のための、ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体を含有する医薬。

## 【請求項2】

対象が霊長類、好ましくはヒトである、請求項1記載の医薬。

## 【請求項3】

治療難治性多発性硬化症および/または進行段階にある多発性硬化症の処置のための、請求項1または2の医薬。

## 【請求項4】

治療難治性関節リュウマチおよび/または進行段階にある関節リュウマチの処置のための、請求項1または2に記載の医薬。

## 【請求項5】

抗体が、Doc-1、Doc-2、Doc-3およびMC-21からなる群から選択される、請求項1~4のいずれかに記載の医薬。

## 【請求項6】

処置が、末梢血中のCCR2を発現する単球の95%、好ましくは90%、より好ましくは80%の枯渇を達成するために必要な用量を超えないように選択される医薬の有効用量を用いて行われる、請求項1~5いずれかに記載の医薬。

## 【請求項7】

処置が、末梢血中のCCR2を発現する単球の少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%が枯渇されているように選択される医薬の有効用量を用いて行われる、請求項6に記載の医薬。

## 【請求項8】

処置が、血漿中のインターロイキン-6(IL-6)および/またはインターロイキン-4(IL-4)のレベルの20倍を越える増加をもたらさない、好ましくは10倍以下の増加をもたらすように選択される医薬の有効用量で行われる、請求項1~5いずれかに記載の医薬。

## 【請求項9】

処置が、0.01-20mg抗体/対象体重kg/日に対応するように選択される医薬の有効用量で行われる、請求項1~5いずれかに記載の医薬。

## 【請求項10】

対象において多発性硬化症の処置のために単球を枯渇させることができる抗体を含有する医薬。

## 【請求項11】

医薬が、請求項2~3および5~9の1以上におけるように、さらに規定されている、請求項10記載の医薬。

## 【請求項12】

対象における関節リュウマチの処置のために単球を枯渇させることができる、抗体を含有する医薬。

## 【請求項13】

医薬が、請求項2および4~9の1以上におけるように、さらに規定されている、請求項12に記載の医薬。

## 【請求項14】

単球とケモカイン受容体CCR2に結合できる抗体を接触させること、特にヒトまたは動物の身体の外科的または治療的処置を構成する方法を排除すること、を含む単球を枯渇するための方法。

## 【請求項15】

ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体を投与する工程を含む、対象における多発性硬化症および/または関節リュウマチの処置のための方法。

## 【請求項16】

10

20

30

40

50

対象が、霊長類、好ましくはヒトである、請求項15記載の方法。

【請求項17】

多発性硬化症が、治療難治性多発性硬化症および/または進行段階にある多発性硬化症である、請求項15または16いずれかに記載の方法。

【請求項18】

多発性硬化症が、治療難治性関節リュウマチおよび/または進行段階にある関節リュウマチである、請求項15または16いずれかに記載の方法。

【請求項19】

抗体が、Doc-1、Doc-2、Doc-3およびMC-21からなる群から選択される、請求項15～18のいずれかに記載の方法。

10

【請求項20】

処置が、末梢血中の単球の95%、好ましくは90%、より好ましくは80%の枯渇を達成するために必要な用量を超えないように選択される有効用量で行われる、請求項15～19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】

処置が、末梢血中の単球の少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%が枯渇されるように選択される有効用量で行われる、請求項20記載の方法。

【請求項22】

処置が、血漿中のインターロイキン-6(IL-6)および/またはインターロイキン-4(IL-4)のレベルの20倍を超える増加をもたらさない、好ましくは10倍以下の増加をもたらすように選択される有効用量で行われる、請求項15～19のいずれかに記載の方法。

20

【請求項23】

処置が、0.01-20mg抗体/対象の体重kg/日に対応するように選択される有効用量で行われる、請求項15～19のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体を投与する工程を含む、対象における単球の枯渇のための方法。

【請求項25】

多発性硬化症および/または関節リュウマチが、上記方法により対象において処置される、請求項24記載の方法。

30

【請求項26】

対象における多発性硬化症および/または関節リュウマチの処置のための医薬製造のための、ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体の使用であって、該医薬が好ましくは請求項1-9のいずれか一つにあるように規定されている、使用。

【請求項27】

対象における多発性硬化症および/または関節リュウマチの処置のための医薬製造のための、単球を枯渇させることができる抗体の使用であって、該医薬が好ましくは請求項10-13のいずれか一つにあるように規定されている、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、抗体による多発性硬化症および/または関節リュウマチの処置に関する。

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症は、神経線維の髄鞘が破壊される、即ち神経線維が脱髄される、中枢神経系の疾患である。現在までのところ、病因および病態生理は、不十分にしか理解されていない。おそらく、外的および内生的に調節される免疫学的過程が問題である。多発性硬化症の症状は、比較的非特異的であって、例えば痙攣性麻痺および他の運動および感覚欠損を含む。

【0003】

50

現在までには、多発性硬化症の満足のいく治療は可能ではなかった。例えば、今までのところ、治療がステロイドの高用量投与により、さらにアザチリオプリン (azathioprine)、酢酸グラチラマー、メトトレキサート、ミトキサントロンの投与によるか、または免疫調節処置、例えばインターフェロンなどによって実施される。しかし、これは該疾患の急性期の頻度および強度を単に低下させるだけであり、該処置は症候の緩和に向けられる。

#### 【0004】

Schneiderらは、ケモカイン受容体CCR2を発現する細胞の枯渇は、炎症性疾患の処置のための潜在的なストラテジーであることを言及している(Schneider, M.A., Bruehl, H. Wechselberger, A., et al.(2005), *In vitro and in vivo properties of a dimeric bispecific single-chain antibody IgG-fusion protein for depletion of CCR2+ target cells in mice* (European Journal of Immunology, vol. 35, p. 987-995)。著者は、二重特異的抗体、特にCCR2に対する抗体によりマウスにおけるCCR2-陽性細胞の溶解を記載している。しかしながら、治療効果は全く示されていない。

10

#### 【0005】

関節リウマチは、主に関節に影響し、変形、さらには動作制限をもたらす慢性の炎症性の全身性疾患である。症状は、例えば腫れ、痛みおよび制限される動作である。関節リウマチの病因は未だ説明されていない。特に、免疫病原性に加えて感染病因および遺伝的要因が考えられる。

#### 【0006】

通常、関節リウマチの治療は、いわゆる抗リウマチ薬、即ち、例えばメトトレキサートおよびレフルノミド (leflunomide) などを包含するDMARD(抗リウマチ薬を修飾する疾患)を用いて行われる。さらに、ステロイドが使用され得る。さらに、生物製剤または免疫抑制剤、例えば、TNF- $\alpha$  [受容体] 遮断薬(例えば、TNF- $\alpha$  またはEthernceptに対するモノクローナル抗体)またはIL-1受容体アンタゴニスト[例えば、アナキンラ (Anakinra)]を用い得る。非ステロイド様抗リウマチ薬(NSAR)は、鎮痛薬治療に主に用いられる。依然として、多くの症例では、該疾患を満足のいくように処置すること、および動かせないようになり得る関節への損傷を回避することは不可能である。

20

#### 【0007】

Bruehlらは、コラーゲン誘発関節炎のマウスモデルにおけるケモカイン受容体CCR2に対するモノクローナル抗体の投与(MC-21)を述べている(Bruehl H, Cihak J, Schneider MA, Plachy J, Rupp T, Wenzel I, Shakarami M, Milz S, Ellwart JW, Stangassinger M, Schlondorff D, Mack M. (2004), *Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells*. J Immunol., vol. 172(2), p. 890-898)。著者は、抗体による関節炎の緩和は、CCR2の遮断が疾患の開始段階の間に生じた場合(コラーゲンを用いる免疫付与の直後と関節炎症の発生前である)にのみ、唯一達成されるが、進行段階の間には達成されないと述べている。進行段階期間には、CCR2の遮断により、関節炎およびコラーゲンに対する免疫応答がさらに悪化する。このことから、該モデル系における疾患の唯一の人工的発生は抗体のみにより影響されること、即ちコラーゲンを用いる動物の免疫付与であることが結論づけられ得る。しかし、疾患それ自体の処置はこの方法では可能ではない。

30

40

#### 【0008】

Brodmerkelら(2005)は、マウスCCR2受容体の小分子アンタゴニスト、即ちINCB3344を記載している(Brodmerkel, C.M., Huber, R, Covington, M., Diamond, S., Hall, L., et al.(2005), *DiscoveryおよびPharmacological Characterization of a Novel Rodent-Active CCR2 アンタゴニスト、INCB3344*)。該分子は、実験的自己免疫性脳炎(EAE)のマウスモデル、多発性硬化症のモデルで試験された。しかし、該投与は、はやくも数匹の動物が疾患の臨床徴候を示した時点で(それぞれ免疫付与後0日および7日目)開始された。Brodmerkelら(2005)は、アジュバント誘発性関節炎のモデルのラットにおいて、INCB3344の投与をさらに説明するものである。また、該投与は、はやくもラットが該疾患のあらゆるまた

50

は非常に小さな臨床徴候のいずれも示さなかった時点で(免疫付与後9日)開始された。

【0009】

要約すると、現在、多発性硬化症および/または関節リウマチについて満足のいく治療は存在しないと結論づけ得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

この背景技術から、本発明の目的は、多発性硬化症および/または関節リウマチのための処置に関する新規の可能性を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

この目的は、多発性硬化症および/または関節リウマチ患者における処置のための、ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体を含有する医薬および患者における多発性硬化症および/または関節リウマチそれぞれの処置のための医薬の製造のための該抗体の使用によって、解決できる。

【発明の効果】

【0012】

驚くべきことに、本発明の内容から、CCR2に対する抗体の投与は、文献における見解とは反対に(上記に引用した、特にBruehlら(2004)を参照されたい)、多発性硬化症および/または関節リウマチの臨床的改善を有効とし得ることが判った。つまり、CCR2に対する抗体を投与することによって、関節リウマチの臨床的改善は十分に達成される、好ましくはBruehlら(2004)によって選択される用量よりも低い用量で達成される得ることが判った。同様に、多発性硬化症の臨床的改善が為され得ることが見出された。

【0013】

さらに、驚くべきことに、処置は、動物モデルにおいて疾患の開始期間中だけでなく、該疾患の明確な臨床症状が既に存在している場合においても可能であることが見出された。特にヒト臨床診察を必要とする場合、比較的後期の治療的行為が可能となる。

【0014】

ケモカイン受容体CCR2は、当業者には知られている[例えば、entry no. 601267 in the database Online Mendelian Inheritance in Man (see OMIM on the website of the National Institute of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)]。この受容体は、ヒトにおける2つの異なるスプライス変異体に存在するCCタイプのケモカイン受容体、CCR2AおよびCCR2Bである(Wong, L.-M., Myers, S.J., Tsou, C.-L., et al. (1997) OrganizationおよびDifferential Expression of the Human Monocyte Chemoattractant Protein 1 receptor gene: Evidence for the role of the Carboxyl-Ternubal Tail in Receptor Trafficking. J. Biol. Chem., vol. 272, p. 1038-1045)。該分子は、ヒト単球の化学誘引物質タンパク質-1受容体遺伝子(human monocyte Chemoattractant protein-1 receptor gene)の名称としても知られている。この受容体は、7回膜貫通型ドメインG-タンパク質共役型受容体である。いくつかの他の種由来のCCR2の対応するオルトログも知られており、例えばヒトCCR2から始まる配列探索により、当業者は容易に決定出来る。

【0015】

用語「抗体」は、当業者には知られている。本発明に従って、用語「抗体」は、広い範囲にて理解され、特にポリクローナル、モノクローナルおよび組換え産生抗体、ならびにそのフラグメントであり、例えばFv、Fab、およびF(ab)<sub>2</sub>フラグメント、これは一本鎖(単鎖)であり得る。好ましくは、該抗体は、アイソタイプIgGのものである。好ましくは、該抗体は、エフェクター作用、例えばADCC(抗体依存性細胞毒性)または補体活性化を誘導できるアイソタイプのものである。これは、例えばヒトIgG1またはマウスIgG2aについての場合であろう。好ましくは、該抗体は、患者の免疫系により、可能なら、拒絶されないか、または非常に低い程度にのみ拒絶されるようなものである。これは、例えば患者の種の抗体配列から抗原(ここでは:CCR2受容体)を認識するために必要ではない該領域(例えばFc

10

20

30

40

50

領域)を形成することによって達成され得る。例えば、特にヒトでの適用に適切ないわゆるヒト化抗体は、当業者には知られている。別途修飾される抗体、例えば二重特異的抗体(例えば、上記に既に示したとおりSchneider et al. (2005)を参照されたい)、ダイアボディ、さらにいわゆるバインダーまたはアプタマーであり、これは例えば、ペプチドバックボーンまたは核酸バックボーン、例えばRNAによって作成でき、本発明の内容における用語「抗体」に包含される。好ましくは、本発明の内容における「抗体」は、600 kDa未満、より好ましくは300 kDa未満、さらにより好ましくは200 kDa未満、および最も好ましくは約150 kDaの分子量を有する。バインダーおよびアプタマーの産生を包含する適切なポリクローナル、モノクローナルおよび組換え抗体の産生は、当業者には既知である(例えば、Joerg Knaeblein (editor)、Modern Biopharmaceuticals、vol. 2、p. 635を参照されたい)、実施例も参照されたい。例えば、免疫付与は、CCR2受容体を発現する細胞を注射することにより行い得る。これは、該受容体はその本来の折り畳みにおいて抗原として使用されるという利点を持つ。さらに、抗原のペプチドフラグメントを用いる免疫付与も可能である。好ましくは、対応するペプチドは、CCR2の細胞外ドメイン、特に第一の2つのループから選択される。適切な抗体(バインダーおよびアプタマーを包含する)の同定も、これらの分子を発現する対応する分子または細胞を用いるライブラリーのスクリーニングにより、例えばファージディスプレイにより可能となる。同定の後、該抗体(バインダーおよびアプタマーを包含する)は、当業者には既知の方法によって産生され得る。

10

**【0016】**

好ましくは、本発明の抗体は、抗体の枯渇効果を増強するドメインと結合する。かかるドメインは、当業者には既知である。これについての例は、ADCCまたは補体活性化を誘導するFcドメインである。他の可能性は、毒素と抗体との結合である。また、該抗体は、二重特異的抗体、例えばMC-21の二重特異的変異体であり得る、これはSchneiderら(2005)に記載されており、二次抗原としてマウスCD3 を認識する(既に上記したようなSchneiderら(2005))。

20

**【0017】**

本発明の該抗体は、ケモカイン受容体CCR2に結合できる。好ましくは、該抗体は細胞外CCR2ドメインのループ1およびループ2に結合する。好ましくは、該抗体は、 $10^7$  M以上の、より好ましくは $10^8$  M以上の、さらにより好ましくは $10^9$  M以上の、最も好ましくは $10^{11}$  M以上の解離定数 Kdにて結合する。好ましくは、該結合は特異的である。本発明の内容における特異的結合とは、生理学的条件(即ち、例えば生理食塩溶液中、細胞培養物中、またはインビボにおいて、好ましくは対応する患者の血液または組織)下で、該抗体が、他のタンパク質と比較して、特に類似タンパク質と比較して(例えば、CCR5、CCR1、CCR3または他のケモカイン受容体および7回の膜貫通ドメインを有するG-タンパク質-共役受容体と比較して、好ましくはCCR5と比較して)、CCR2に対して少なくとも10倍の親和性、好ましくは20倍親和性、より好ましくは50倍親和性、最も好ましくは100倍親和性にて、CCR2に結合することを意味する。しかしながら、他のタンパク質への結合は、抗体の治療効果と干渉しない限り許容性であり得る。しかし、他種由来のオーソロガスCCR2受容体との交差反応性は起こり得る、そしていくつかの種において抗体の適用を可能にするためには有利であり得る。かかる交差反応性は、稀ではなく、交差反応性の決定の仕方は当業者には知られている。この問題に関してさらなる詳細は、実施例からも理解され得る。

30

40

**【0018】**

好ましくは、本発明に従って使用されるべき該抗体は、ケモカイン受容体CCR2を阻害できる。抗体がケモカイン受容体CCR2を阻害するかどうかは容易に決定できる。例えば、かかる抗体は、CCR2、例えば単球により走化的に反応する細胞のMCP-1-およびMCP-3誘導性走化作用を低下させる。各々マウスまたはヒト由来の対応する細胞の例は、各々末梢血(PBMC)由来のMonomac6細胞またはヒト単球である。対応するアッセイは実施例に記載されている。

**【0019】**

さらに、ケモカイン受容体CCR2の阻害は、MCP-1結合のおよびMCP-1により誘導された力

50

ルシウム流入の阻害が生じるという事実によって決定され得る。対応するアッセイは実施例に記載されている。

【0020】

適切であるか、または修飾抗体についての開始点が類似し得る抗体についての例示は、DOC-1、DOC-2、DOC-3およびMC-21からなる群の抗体である。抗体DOC-1、DOC-2、DOC-3の産生に加えて、それらの特徴は、実施例に記載されている。

【0021】

本発明の医薬は抗体を含有する。さらに、該医薬は当業者が十分に考慮するアジュバントのあらゆるタイプを含有し得る。かかるアジュバンドは、例えば担体物質、例えばスターチ、ラクトース、脂肪、ステアリン酸、アルコール、生理学的生理食塩水または他の添加物であり得る。具体的には、抗体を安定化するアジュバンドおよび保存料が考慮される。

10

【0022】

医薬の投与は、医薬に含有される抗体があらゆる既知の方法を用いて実施され得る、この方法により、標的細胞、即ち特にインビトロまたはインビボで単球に挿入され得る。例えば、医薬は、注射により投与され得る、例えば静脈的に(i.v.)、皮下に(s.c.)または腹腔内に(i.p.)、溶液または点滴の形態にて投与され得る。しかし、また他の投与様式、例えばマイクロカプセル形態またはインプラントの形態が考えられる。好ましくは、医薬の投与は、抗体が血液循環中にまたは個々の標的領域中に入るように行われる。また、考慮され得るものは、標的領域、例えば多発性硬化症の症例では中枢神経系、例えば脳脊髄液中への、または関節リウマチの症例では罹患した関節中への直接投与である。

20

【0023】

該疾患の多発性硬化症および関節リウマチは、当業者には既知であり、導入部分にすでに説明されている。

【0024】

用語「処置」もまた当業者に知られている。本発明の内容において、処置は、多発性硬化症および/または関節リウマチ患者における臨床的改善をもたらすあらゆる種類の診療行為に関する。臨床的改善は、例えば多発性硬化症では、例えば神経損傷(例えば痙攣)の低下を測定することによって決定される。関節リウマチにおいては、臨床的改善は、例えば症候、例えば腫れ、炎症または痛みの減退によって決定され得る。好ましくは、該改善は、例えば少なくとも0.25ユニット、好ましくは0.5ユニット、より好ましくは少なくとも0.75ユニット、最も好ましくは少なくとも1.0ユニットの例示に従うEAEスコアの改善に対応する臨床的症状の緩和において現われる。好ましくは、該改善は、例えば少なくとも0.25ユニット、好ましくは、少なくとも0.5ユニット、より好ましくは、少なくとも0.75ユニット、より好ましくは、少なくとも1.0ユニット、最も好ましくは、少なくとも1.25ユニットの例示に従う、EAEスコアの改善に対応する臨床的症状の緩和に現われる。ヒトにおける臨床的改善の推定について、多くのパラメーター、例えば多発性硬化症についてのEDSSスコア(Expanded Disability Status Scale、see Kurtzke、JF (1983). Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology、vol. 33(11)、p. 1444-1452))は十分に知られている。即ち、臨床的改善は、例えば少なくとも0.5、好ましくは少なくとも1.0、より好ましくは少なくとも1.5ユニット、より好ましくは少なくとも2.0ユニット、最も好ましくは少なくとも2.5ユニットのEDSSスコアに従う改善に相応する症候の緩和において現れ得る。さらに、関節リウマチに対するACR(American College of Rheumatology)スコアは、ヒトにおける臨床的改善の推定のために知られている。

30

40

【0025】

好ましくは、該処置は、多発性硬化症および/または関節リウマチに罹患している患者に関する。特に該処置は、該疾患中、特に該疾患の臨床的徴候の存在における処置中に多発性硬化症および/または関節リウマチに関する。該疾患の臨床的徴候は、例えば1.0以上、好ましくは1.5以上、さらにより好ましくは2.0以上、さらにより好ましくは2.5以上

50

、特に3.0以上のEAE-スコア(実施例を参照されたい)に対応する。該疾患の臨床的徴候は、例えば一足あたり、1.0以上、より好ましくは2以上、さらにより好ましくは3以上、さらにより好ましくは4の関節炎スコア(実施例を参照されたい)にさらに対応する。ヒトにおける臨床徴候を推定するために、多くのパラメーターがよく知られており、例えばEDSSスコア(Expanded Disability Status Scale、see Kurtzke、JF (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology、vol. 33(11)、p. 1444-1452))、さらに関節リウマチについてはACR(American College of Rheumatology)である。

【0026】

さらに、該処置は、特に治療難治性の多発性硬化症および/または関節リウマチ、即ち各疾患の形態に関し、この臨床的改善はこれまでに知られている薬剤を用いて達成出来なかった。十分な患者数において、該疾患の経過は、これまでに知られた薬剤を用いては臨床的改善がこれ以上見込めないようなものであった。さらに、この処置は、各疾患を有する患者に関し、この患者において望ましくない副作用は、これまでに存在している処置方法を用いて許容出来ない程度生じる。該処置は進行段階にある各疾患にも関し得る。

【0027】

本発明の内容において患者は、脊椎動物であり、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物とは、例えば齧歯類であり得る(例えば、マウス、ラットまたはウサギ)、ブタ、イヌ、ネコまたは霊長類である。好ましくは、該哺乳動物は霊長類(例えば、ニホンザルまたはコモン・マーモセットまたはヒト)である。特に好ましい患者はヒトである。

【0028】

通常、有効用量は医薬の投与のために決定される。用語、「有効用量」および「有効用量の決定」は、当業者には知られており、さらに当業者は、有効量を決定するために、本明細書で提供された情報にたしかえることも出来る。用量は、処置される疾患の臨床的改善をもたらすのに有効であると解される。特に、本発明の内容において、多発性硬化症症候および/または関節リウマチ患者において緩和を有効にする医薬の用量が、有効用量であると解される。有効用量は、例えば末梢血中のCCR2を発現する単球の少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%が枯渇されるように選択される用量である。ここで、単球の枯渇とは、細胞破壊であると理解される。

【0029】

好ましくは、医薬の有効用量は、多発性硬化症および/または関節リウマチの処置に関する満足のいく成功を提供する最低用量に近似するように選択される。特に適切な有効用量は、望ましくない副作用に対する効果の望ましい割合が達成されるまで試験系において用量増加を継続することによって決定され得る。本発明の内容において、これは、例えば処置される疾患が、用量のさらなる増加に対して、これ以上臨床的にさらに改善されない場合(場合によっては該症例がさらに悪化する)および/または治療効果と比較して望ましくない副作用がもはや許容できない場合であろう。

【0030】

例えば、用量とは、末梢血液中のCCR2を発現する単球の99%、好ましくは98%、より好ましくは95%、より好ましくは90%、より好ましくは80%、より好ましくは70%、さらにより好ましくは50%の枯渇を達成するのに必要な用量を超えない用量を考えられるべき必要がある。本発明の内容において、該用量は、単球に関して強力な枯渇をもたらすが、非常に高いという訳ではなく、顕著な臨床的改善をもたらす、該疾患を悪化させないことを示すことが出来た。特に、これは関節リウマチに関する。

【0031】

あるいは、該用量は、インターロイキン-6(IL-6)および/またはインターロイキン-4(IL-4)の放出をもたらすかどうかに基づいて推定され得る。該用量の推定は、特にIL-6の放出を基にし得る。そのように、該用量は過剰なIL-6および/またはIL-4の放出をもたらさないような低用量を選択出来るのが好ましい。例えば、用量は、血漿においてIL-6

10

20

30

40

50

および/またはIL-4のレベルの20倍以上の増加、好ましくは10倍以上の増加、より好ましくは5倍以上の増加、最も好ましくは2倍以上の増加をもたらさないように選択され得る。この関連において、該増加は、患者の血漿中のIL-6および/またはIL-4の正常レベルに関連がある。医薬の投与が行われる前に有する患者のそのレベルが、この明細書中でIL-6および/またはIL-4の“正常”レベルとして見なされるのが好ましい。IL-6および/またはIL-4の放出が医薬の投与によりもたらされると考えられ得る場合を当業者は知っている。抗体の腹腔内注射2～6時間後のIL-6および/またはIL-4のレベル増加を、医薬によりもたらされるものとして見なすことができる。

【0032】

さらに、用量は、適切な用量として見なされるべきであり、この下限は、任意に0.01; 0.02; 0.03; 0.05; 0.07; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; または3.0mg抗体/kg患者の体重/日に対応し、この上極限は、任意に1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0; 5.0; 7.0; 10; 12; 14; 17; または20mg抗体/kg患者の体重/日に対応しており、ここで該限定は、いずれかの方法で互いに組み合わせられてもよいが、しかし正数の範囲がこの限定に含まれるように選択される。かかる範囲の例示は、0.01-20または0.01-2または2.5-20 mg抗体/kg患者の体重/日である。

【0033】

さらに、本発明は、多発性硬化症および/または関節リウマチ患者においてケモカイン受容体CCR2に結合できる抗体を含有する、および各多発性硬化症および/または関節リウマチ患者において単球を枯渇させる医薬の製造のための該抗体の使用医薬に関する。

【0034】

さらに、本発明は、多発性硬化症および/または関節リウマチ患者において単球を枯渇出来る抗体を含有する医薬および各々多発性硬化症および/または関節リウマチ患者において該処置のための医薬の製造のための該抗体の使用に関する。

【0035】

全ての好ましい実施形態および本発明の修飾および自明として明細書中に例示した定義は、2つの上記した医薬および対応する様式における使用にも関する。

【0036】

本発明の内容において、ケモカイン受容体CCR2を阻害することができる抗体の投与により、CCR2を発現する単球の枯渇をもたらし得ることが判った。

【0037】

本発明者は、多発性硬化症および/または関節リウマチの該処置が、CCR2を発現する炎症性単球の枯渇により選択的に起こると考える。

【0038】

本発明の内容において、単球の枯渇とは該対応する単球の破壊であると理解される。

【0039】

枯渇に関する機構は、抗体設計により影響され得る。好ましくは、該枯渇はADCC(抗体依存性細胞毒性)および/または補体活性化を基にした細胞溶解機構によって達成される。しかし、補体活性化の場合には、炎症性反応、例えば補体分子C3aおよびC5aを介する炎症性反応の増加はおこらないという事実には注意を払われなければならない。ADCCを基にした枯渇は、例えばCD16/32またはCD64を介して媒介され得る。ADCCにより、単球が互いを枯渇させることが出来る。

【0040】

本発明の抗体の助力による枯渇は様々な種において達成され得る。例えば、マウスおよびヒトの単球集団は類似している。例えば、マウスにおいても、炎症性(CD11b<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>low</sup>)および非炎症性(CD11b<sup>+</sup> CCR2<sup>-</sup> GR1<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub><sup>high</sup>)単球への血液単球の二分化を観察できることは知られている(Geissmann F, Jung S, Littman DR. (2003), Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties (Immunity, vol. 19(1), p. 71-82.)。ヒトでは、これらの2つの単球集団は、既に長い間知られており、表面マーカーのCD14およびCD16の発現レベルによって主に

決定されている(Ziegler- -Heitbrock HW (2000). Definition of human cblood monocytes. J Leukoc Biol., vol. 67(5)、p. 603-6.)。

【0041】

別の実施形態において、CCR2に対する抗体以外のもの、好ましくはCD14、CD33、CD64、CD68、CD91、CD115およびCD163からなる群から選択される単球に特異的な少なくとも一つの抗体を、該処置のためにさらに使用できる。特に好ましいのはCD14である。かかる実施形態は、患者が霊長類、特にヒトである場合に特に有利であり得る。

【0042】

他の実施形態において、本発明は、ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体と単球を接触させることを含む単球を枯渇させるための方法に関する。ここで、ヒトまたは動物の身体の外科的または治療的処置を示す方法は排除され得る。好ましくは、この接触は、インビトロで行われる。用語「インビトロ」は、本発明ではその最も広い可能な形態にあると理解される。それは生体外で行われるあらゆる方法に関し、即ち具体的には、細胞培養、組織培養物または臓器培養物中で起こる方法にも関する。用語“インビトロ”は、特に患者の身体以外の該処置に関する方法を含むと理解される。

10

【0043】

本発明は、さらに、ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体を投与する工程を含む、多発性硬化症および/または関節リウマチ患者における処置のための方法に関する。

【0044】

本発明は、さらに、ケモカイン受容体CCR2に特異的に結合できる抗体を投与する工程を含む、患者における特異的単球の枯渇のための方法に関する。

20

【0045】

好ましい実施態様および本発明の修飾および既に自明として上記した定義の全ては、対応する様式における2つの上記した方法にも関する。

【0046】

図面の簡単な説明：

図1

単球枯渇の速度論。MC-21またはアイソタイプコントロール抗体各々の毎日投与(10 $\mu$ g)は、少なくとも5日間にマウス末梢血からのGR1+単球の枯渇を導く。グループあたり5匹のマウスを試験した。血液の消退は、抗体注射約7時間後におきた。GR1+単球とCD19+B細胞(抗体処置により本質的に影響されない)の比率を基にして、MC-21抗体によるGR1+単球の枯渇を認識できる、これは少なくとも5日間持続する。日、Tag

30

【0047】

図2

高濃度で、MC-21はIL-6の放出を誘導した。C57BL/6-マウスを、100 $\mu$ gまたは10 $\mu$ gのMC-21抗体を用いて腹腔内的に処置した。注射2時間後、血漿中のIL-6レベルをELISAにより(酵素結合免疫吸着法)測定した。高用量でのみ、該MC-21抗体はIL-6を放出させた。抗CCR2、MC-21抗体;i.p.、腹腔内。

40

【0048】

図3

A. 様々なMC-21濃度により、関節炎の経過が示差的に変化した。コラーゲン誘発関節炎のモデルにおいて(一日目に完全なフロイントのアジュバント中および21日目に不完全なフロイントのアジュバント中の各々において100 $\mu$ gコラーゲンを用いるDBA/1マウスの免疫付与)、高用量MC-21抗体(50 $\mu$ g)の毎日投与(21-32日間)により、関節炎が明らかに悪化する一方、低用量(10 $\mu$ g)でのMC-21毎日投与により関節炎が明らかに改善した。

【0049】

B. MC-21抗体(抗CCR2)(10-20 $\mu$ g/日 i.p.)の毎日の低用量投与はまた、関節炎がすでに明らかに進行していた場合にも、コラーゲン誘発関節炎モデルにおいて治療上有効であった。マウスをコラーゲン(完全または不完全なフロイントのアジュバント各々において200

50

μg)を用いて3週間の間隔で2回投与した。関節炎(スコア3)の明確な徴候の出現後までに、該抗体処置を開始した(0日)。MC-21の投与は該疾患の停止をもたらすが一方で、コントロール群(MC-67の投与)において該疾患は明らかに進行した。MC-21およびMC-67群の間の相違は有意であった( $p < 0.05$ 、日数1-6の間)。0日から計算した関節炎の増加は、MC-67群内で非常に有意であった。MC群内において、関節炎の変化は有意でなかった。

【0050】

図4

炎症性単球の枯渇は、多発性硬化症の動物モデルとして実験的な自己免疫脳脊髄炎(EAE)の経過を改善した。20 μgのMC-21の適用は、該アイソタイプコントロール(IgG2b)ではなく、該疾患の経過を有意に改善した。MC-21抗体または該アイソタイプコントロールを、17日(疾患のピーク)から開始して免疫付与後34日まで毎日投与した。2.5の重症度(スコア)の臨床的程度は、後脚の片側麻痺を伴う併発における後脚の明らかな衰弱に相当する。1.0のスコアは、後脚の力/運動機能が保持されている場合の尾部麻痺に相当する。毎日、Taglich; 臨床的EAEスコア、klinischer EAE-Score; 免疫付与後の日数、Tage nach Immunisierung.

10

【0051】

図5

免疫付与後35日、MC-21で処理したマウスにおけるEAE期間のミエリンへの軽度の損傷。脱髄の定量。MC-21処理した動物はミエリンを、明らかにより多く保存していた。IgG2b、アイソタイプコントロール; 脱髄、Demyelinisierung.

20

【0052】

図6

アイソタイプコントロール抗体(5 mg/kg体重各々)の注射とは対照的に、抗体DOC-2およびDOC-3の注射により、コモン・マーモセットの末梢血中のCCR2-陽性単球数が低下した。白血球の総数を参照して、CCR2-陽性単球の相対的な比率を示し、この値を各日数について、アイソタイプコントロール抗体で処置された群における100%に対して正規化した。CCR2<sup>+</sup>末梢血単球、CCR2 positive Monozyten im peripheren Blut; 0 hに注射した抗体、injizierter Antikoerper bei 0 h; アイソタイプコントロール、Isotypkontrolle.

【0053】

図7

非ヒト霊長類における炎症性単球の枯渇は、体重の安定化(A.)に加え神経学的欠損(B.)の低下をもたらす。成体メスのマーモセット(Callithrix jacchus)を、抗ヒトCCR2抗体DOC-2およびアイソタイプ抗体(IgG1)(5 mg/kg i.p.)各々を用いて処理した。抗体の適用を、最初の明白な神経学的症状が動物に現れた直後に開始した。その後、該マーモセットを2日毎に処理した。

30

【0054】

図8

該処置を該疾患のピーク時に開始した場合に、抗ヒトCCR2抗体の治療的投与により寿命が有意に延びた。成体メスのマーモセット(Callithrix jacchus)を、該疾患のピーク時に開始してその後死亡するまで2日毎に、抗ヒトCCR2抗体DOC-2(抗CCR2、5 mg/kg i.p.、n=2)およびPBS (n=2)各々を用いて処置した。

40

【0055】

下記実施例において、本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲の限定として理解されるべきではない。

【実施例】

【0056】

実施例:

インビボでの炎症性単球の枯渇に対する手段としてのMC-21抗体:モノクローナル抗体MC-21(Mack, M, Cihak J, Simonis C, et al.. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. J Immunol. 2001 vol. 166(7)、pp. 469

50

7-704)は、マウスCCR2に特異的に結合し、密接に関係したマウスCCR5受容体とあらゆる交差反応を示さない。それは単球との強力な結合を示し、ここでマウスにおけるGR1+単球の部分集団は該抗体により認識される。

【0057】

インビボのMC-21抗体の効果および速度論：C57BL/6マウスへのMC-21抗体の一回の腹腔内注射により、血液および脾臓(図1)からの単球(CCR2+GR1+単球)の炎症性部分集団をほぼ完全に枯渇させた。MC-21の注射用量により、単球の枯渇は様々な期間持続した。5-100 $\mu$ gを注射した場合に、24時間後にはまだGR1+単球の完全な枯渇を観察したが、48時間後にはGR1+単球の部分集団の出現を再び観察した。高用量のMC-21(100または500 $\mu$ g)の注射により、2-3日の間持続する単球枯渇が生じた(血漿中での抗体のより長期の存在に対応する)。MC-21抗体の反復注射により、単球の枯渇を約1週間(図.1)維持できた。その後、MC-21抗体のCCR2結合能力の損失は、マウス抗ラット抗体を阻害するという状況により生じた。抗CD16/32(クローン2.4G2 ATCC HB197)を介するFc受容体Fc $\gamma$ RIIIおよびFc $\gamma$ RIIに対する抗体の同時注射が血液および脾臓中のMC-21媒介性枯渇を低下したため、GR1+単球のMC-21媒介性枯渇はFc受容体により優先的に媒介された。CD16/32抗体によって阻害され得ないMC-21媒介性単球枯渇の該部分は、CD64に依存して補体依存性機構またはADCC機構のいずれかに基づいていると考えられる。

【0058】

MC-21抗体もまた、CCR2を発現する好塩基性顆粒球に対して効果を示した。MC-21抗体を用いる完全なネズミ骨髄のインキュベーションは、IL-6のかなりの放出をもたらした。完全な骨髄からの好塩基性顆粒球の枯渇が、十分に低下したMC-21-誘導性IL-6放出をもたらしたので、このIL-6放出は好塩基性顆粒球に依存性であった。また、単離した好塩基性顆粒球(DX-5に対する磁性ビーズによる単離、その後のCD45およびDX-5発現によるFACSソーティング)を刺激して、MC-21抗体とのインキュベーションによりIL-6を放出させた。CCR2欠損マウスの好塩基性顆粒球を、MC-21により刺激せずにIL-6を放出させた。これらのデータは、MC-21が好塩基性顆粒球の活性化を誘導すること、およびこの活性化はMC-21とCCR2との結合により生じることを示す。好塩基性顆粒球もまた、イムノグロブリンFc受容体(特にCD16/32)の強力な発現を示したため、これらの受容体がMC-21の固定化のために重要であり、おそらく好塩基球の活性化にも関与すると考えられる。インビボでは、好塩基性顆粒球の活性化はMC-21の投与用量に依存性であった。MC-21(10 $\mu$ g)の注射によりインビボにてIL-6の放出がないことを観察したが、100-500 $\mu$ gの注射により明らかなIL-6の放出を誘導した(図.2)。

【0059】

単球の枯渇をMC-21低用量(例えば、5-10 $\mu$ g)にて既に達成できたので、またIL-6が、関節炎の進行に対して望ましくない効果を示したので、これは、低用量のMC-21の反復注射によりMC-21を介して好塩基球の同時活性化なしに単球枯渇を有効にする可能性をもたらした。

【0060】

分析のために、オスのDBA/1-マウスにおけるコラーゲン誘発性関節炎(CIA)のモデルを使用した、これは多くの特徴においてヒト関節リウマチ(RA)に類似し、また臨床診察に現在使用されている重要な療法の臨床開発前に用いるモデルである。コラーゲン誘発性関節炎のモデルにおいて、該関節炎は、主にウシコラーゲンをを用いて一回(1日)または2回(1日および21日)の免疫付与により誘導される。

【0061】

該疾患モデルの1日からCCR2に対する抗体を用いる処置はコラーゲンをを用いる免疫付与と干渉し、そのため関節炎は低い程度で起こった。コラーゲンをを用いる一次免疫付与の時点での抗CCR2抗体の阻害効果とは対照的に、後の時点では(4日、9日または21日から)高濃度(500 $\mu$ g/マウス3日毎)でのCCR2を遮断する抗体MC-21の適用により、臨床的および組織学的な重症度を有意に悪化させた。この効果は、コラーゲン(有意に高い抗コラーゲン抗体力価)に対する高い体液性免疫応答を伴って生じた。また、CIA-感染株DBA/1と戻し交配

10

20

30

40

50

されたCCR2欠損マウスは、高い関節炎を示した(Quinones MP, Ahuja SK, Jimenez F, Schaefer J, Garavito E, Rao A, Chenux G, Reddick RL, Kuziel WA, Ahuja SS (2004). C Cケモカイン受容体2-ヌルマウスにおける実験的な関節炎は、重度のヒト関節リウマチを密接に擬態する(J Clin Invest., vol. 113(6), p. 856-66.)。これらのデータは、関節炎誘導後のCCR2の阻害または該疾患の全経過期間のCCR2の欠失により関節炎が増大したことを示唆する。文献の記載によれば、そのため、CCR2は、炎症性リウマチ疾患の該処置のためには不適當な標的として評価されることになった。

#### 【0062】

驚くべきことに、低用量のMC-21抗体(ここで、腹腔内に一日あたり10 µg)による処置が、コラーゲン誘発関節炎進行段階中にも明らかな改善をもたらしたことを本発明において示すことが出来た(図.3A)。21日から開始してMC-21抗体を提供した。これと比較して、MC-21(50 µg/日)の高用量で21日からこの毎日の処置は関節炎の明らかな悪化をもたらした。好塩基性顆粒球を活性化させるIgEに対する抗体の投与(21日から)は、さらに関節炎の明らかな悪化をもたらした。

10

#### 【0063】

MSモデルにおける単球枯渇：MSの動物モデル、実験的な自己免疫性脳脊髄炎(EAE)において、該疾患を、様々なミエリン成分(例えば、MOG<sub>35-55</sub>)により、またはこれらの成分に対する自己反応性T細胞の養子免疫伝達により誘導できた。

#### 【0064】

他の研究において、選択的小分子CCR2-アンタゴニストは、該疾患の強化症状が出現する前に与えられれば、EAEの該経過に陽性に影響することが示された(Brodmerkel CM, Huber R, Covington M, Diamond S, Hall L, Collins R, Leffert L, Gallagher K, Feldman P, Collier P, Stow M, Gu X, Baribaud F, Shin N, Thomas B, Burn T, Hollis G, Yelawaram S, Solomon K, Friedman S, Wang A, Xue CB, Newton RC, Scherle P, Vaddi K (2005). Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344. J Immunol., vol. 175(8), p. 5370-8.)。Brodmerkelらにおいて、発症機序は、脳に対する単球の低下した移動である可能性であった。しかし、脳に対する単球移動の阻害は、該疾患の後期の段階で多数の単球が脳内に既に存在している場合には、治療上有効であるかどうかは依然として疑わしい。即ち、Brodmerkelの結果は、このモデル系において該疾患を人為的に開始させる操作が理由であると思われる。驚くべきことに、本明細書において、CCR2を基にした処置法は、進行またはエフェクター相のEAE段階、即ち該疾患の間における治療法として有効であることが示された。

20

30

#### 【0065】

モノクローナル抗CCR2抗体MC-21または各アイソタイプコントロール(IgG2b) (20 µg)を、一次免疫付与後の17日(疾患のピーク)から34日まで毎日腹腔内投与した、即ち該疾患のピークから開始する(2.5のEAEスコア、即ち片側後脚麻痺のある後脚の衰弱)。該疾患の経過に関する明らかな統計学的に有意な低下を観察できた(図.4)。1.0の臨床的な重症度は、尾部麻痺を意味する。興味深いことに、関節炎モデルとは対照的に、比較的高用量のMC-21 Ab(250 µg)は、臨床的経緯の改善をもたらした。MC-21によるEAEモデルにおける好塩基球の機能的に関連のある活性化を、処理した動物の血清中のIL-6の増加によるかまたは抗IgE投与による該疾患の経過の変調のいずれによっても検出できなかった。

40

#### 【0066】

臨床的に重度の非常に明白なおよび統計的に有意な改善は、免疫付与後35日にMC-21処理動物中のCD3<sup>+</sup>T細胞およびMAC-3<sup>+</sup>マクロファージ数が低下したという実施例によって示され得るとおり、中枢神経系中の浸潤性単核細胞の明白な低下を伴った。

#### 【0067】

同様に、処置された動物における組織損傷を明らかに低下した。例えば、MC-21処理された動物における脱髄のこの程度は、アイソタイプコントロール群よりも明らかに顕著でなかった。

#### 【0068】

50

MC-21で処理され、そうして単球が枯渇した動物におけるCNSで、どのサイトカインおよびケモカインが局所的に形成されるかを決定するために、定量的なPCRを行った。処置された動物の骨髄を、免疫付与後35日に採取し、該RNAを抽出し、逆転写し、定量的なリアル・タイム(RT)PCRにより定量した。化学誘引物質および毒性タンパク質、例えばIP-10、MCP-1およびMIP-1aの明らかにより低い産生が、MC-21処理された動物のCNSに見出された。

【 0 0 6 9 】

次の工程において、哺乳動物(コモン・マーモセット、*Callithrix jacchus*)が、ヒトCCR2に対する抗体と交差反応を示すかどうかを試験した。それを行う際に、ヒトCCR2に対する抗体として、本発明の内容において産生した抗体DOC-1、DOC-2およびDOC-3を分析した。

10

【 0 0 7 0 】

DOC-抗体の産生のために、少なくとも6週齢であったBALB/c-マウスを、完全長CCR2bで安全に形質転換した少なくとも10万のCHO細胞を用いて、少なくとも3週間の期間に、腹腔内的に6-8回免疫付与した。最新の免疫付与4日後、脾臓細胞をX63.Ag8.653骨髄腫細胞と融合し、選択培地で培養した。こうして生成したハイブリドーマの上清を、CCR2bトランスフェクトCHO細胞への結合について、またはコントロールとしてCXCR4-トランスフェクトCHO細胞への結合について各々FACS分析により試験した。陽性培養を2回再クローニングした後に、ヒトCCR2に特異的に結合し、かつマウスCCR2もしくはCCR5かまたはヒトCCR1、CCR3、CCR5もしくはCXCR4の交差反応をいずれも示さない、いくつかのモノクローナル抗体(DOC-1、DOC-2およびDOC-3)を得た。ヒト末梢血液において、該DOC抗体は、T細胞(約20-30%)の部分集団に、さらにCD14+単球(>95%)の非常に多くの数と結合する。30分間37°CでのMCP-1(1 μg/ml)を用いるヒト細胞のプレインキュベーションにより、上記した白血球の部分集団へのCCR2抗体の結合を、実質的に完全に阻害でき、これはCCR2のMCP-1誘導性内在化により説明され得る。これはDOC抗体の特異性をさらに示した。

20

【 0 0 7 1 】

DOC抗体を、その機能的特性に関して包括的に特徴分析した。要約したものを下記に示した：

Doc1:

アイソタイプIgG3を有する；

30

細胞外CCR2ドメインのループ1、2および3に結合する；

37°Cにて末梢血(PBMC)由来のヒト単球に対してCCR2下方調節を誘導しない；

ヒトPBMCに対するMCP-1誘導性CCR2下方調節を遮断する；

Monomac6細胞およびヒトPBMCのMCP-1-およびMCP-3誘導性走化作用を遮断する；

MCP-1結合およびMCP-1誘導性カルシウム流入の部分的阻害を示す。

【 0 0 7 2 】

Doc2:

アイソタイプIgG1を有する；

細胞外CCR2ドメインのループ1+ループ2の先の方の半分に結合する；

40

37°Cにて濃度依存様式でヒトPBMCに対する強力なCCR2下方調節を誘導する；

Monomac6細胞およびヒトPBMCのMCP-1-およびMCP-3誘導性走化作用を遮断する；

MCP-1結合およびMCP-1誘導性カルシウム流入の效果的阻害を示す。

【 0 0 7 3 】

Doc3:

アイソタイプIgG1を有する；

細胞外CCR2ドメインのループ1+ループ2の後方の半分の部分に結合する；

濃度依存様式において、ヒトPBMCでの弱いCCR2下方調節を誘導する；

Monomac6細胞およびヒトPBMCのMCP-1-およびMCP-3誘導性走化作用を遮断する；

MCP-1結合およびMCP-1誘導性カルシウム流入の效果的阻害を示す。

【 0 0 7 4 】

50

この内容において、走化作用を、Transwell filter insertsにより(PBMCについて3  $\mu$ m 孔サイズおよびMonomac6について5  $\mu$ m孔サイズ)測定した、ここで該細胞(PBMCおよびMonomac6、各々)を上部のウェルにおき、ケモカイン(20-200 ng/ml)を最下部のウェルにおいた。約60分間のインキュベーションの後、より低いウェルに移動した細胞の数を計測した。

【0075】

これに関連して、カルシウム流入を、アクエリオンおよびルミネセンス(see Blanpain et al、Molecular Biology of the Cell、vol. 13、723737、2002)を基にしたアッセイにより測定した。DOC抗体のCCR2への結合を、フローサイトメトリーにより測定し、ここで色素標識したウサギ抗マウスIg抗体を二次抗体として使用した。

10

【0076】

抗体の結合エピトープの決定のために、CCR2およびCCR5からなるキメラ受容体を発現する細胞との結合を決定した。CCR2の内在化(下流調節)もまた、フローサイトメトリーにより測定した。

【0077】

コモン・マーモセット(Callithrix jacchus)の白血球に対する抗体DOC-1、DOC-2およびDOC-3とCCR2との交差反応を、FACS分析により試験した。このために、コモン・マーモセットの全血液を、CCR2抗体(5  $\mu$ g/ml)またはアイソタイプコントロール抗体(IgG1およびIgG3各々)の同じ濃度を用いてインキュベートし、PE(フィコエリトリン)-標識した二次抗体(ウサギ(F(ab)<sub>2</sub>フラグメント抗マウスIg、R0439、DakoCytomation)に供した。赤血球の溶解後にFACS分析を行った。コモン・マーモセットCCR2へのDOC抗体の結合特異性をさらに証明するために、全血の一部について、CCR2の内在化を、DOC抗体とのインキュベーション前にヒトMCP-1を用いて誘導した。このために、全血液を1  $\mu$ g/ml MCP-1を用いて30分間37 °Cでインキュベーションし、次に上記したようにDOC抗体の結合を試験した。抗体DOC-2およびDOC-3の強力な結合および抗体DOC-1のわずかな弱い結合を、FACSドットプロットのフォワード・サイドワード分散(the forward-sideward scatter)において分示されるべきである単球集団に対して示した。こうして分けられた単球の約50%は、DOC-2、DOC-3およびDOC-1と結合した。MCP-1-プレインキュベートした白血球を使用した場合には、この結合を完全に失った。アイソタイプコントロール抗体は、単球に対していずれの結合をも示さなかった。単球部分集団を別とすれば、DOC抗体の結合は、非常に少数のさらなる白血球の部分集団に対して発生しただけであり、これはそのフォワード・サイドワード分散を理由とする好塩基性顆粒球として分類されるべきである。DOC抗体により認識される単球集団は一樣にCD11b陽性であって、これは抗体クローン(M1/70、ラット抗マウスCD11b)を用いて染色することにより示された。このCD11b抗体は、ヒトCD11bと、そしてコモン・マーモセットCD11bとも交差反応を示した。

20

30

【0078】

さらに、DOC抗体の薬物動態を試験した。抗体DOC-2およびDOC-3(5mg/kg体重)の注射後の24、48および96時間に抗体の血漿濃度を測定した。このために、サルの血漿を、様々な希釈濃度で、hCCR2bトランスフェクトしたCHO細胞を用いてインキュベートし、DOC抗体の血漿濃度を、抗体DOC-2およびDOC-3の様々な希釈液からなる標準曲線によって計算した：

40

【表1】

血漿濃度 ( $\mu$ g/ml)	注射後24 h	注射後48 h	注射後96 h
DOC-2	159	85	3.3
DOC-3	20	6.3	0.9

【0079】

さらに、CCR2-陽性単球の枯渇がDOC-2またはDOC-3抗体各々の注射後に起こるかどうかを試験した。このために、血液を、抗体DOC-2およびDOC-3およびアイソタイプコントロー

50

ル抗体各々(5 mg/kg体重、群あたり2匹のサル各々に)の注射後24時間、48時間および96時間に採取し、白血球総数のCCR2-陽性単球の割合をFACS分析により決定した。この目的のために、全血液を抗体DOC-2またはDOC-3各々を用いて、その後に上記したようにフィコエリトリン標識した二次抗体を用いて染色し、CCR2-陽性単球を、フォワード・サイドワード分散との関係にて同定した。図7は、白血球全数のCCR2-陽性単球の割合が、注射後第一日目にて、DOC-2またはDOC-3で処理した動物において低下したこと(約50%まで)を示す。アイソタイプコントロール抗体により毎日処置した群における血球の総数のCCR2-陽性単球の割合を100%と設定した。

#### 【0080】

抗ヒトDOC-2抗体の効率を、コモン・マーモセットの末梢血中の炎症性単球の枯渇が高い程度にて示すことが出来た後に、霊長類におけるEAE疾患モデルにおいてこのAbを枯渇化する効力を試験しようと考えた。この目的のために、成体(約3年齢)のメスのコモン・マーモセット(*Callithrix jacchus*)を、完全なフロイントアジュバント(CFA中の組換え体ラットMOGタンパク質)(600  $\mu$ lのCFA中で50  $\mu$ gのMOG)を用いて免疫付与した。3-4週間後に、該動物は最初に神経学症状および食欲不振を示し始めた。疾患の最初の明白な神経学症状によって、我々は、抗ヒトCCR2 抗体DOC-2または対応するアイソタイプコントロール(IgG1)を用いる治療的適用を開始した。次に、コモン・マーモセットを、2日毎にDOC-2 AbまたはアイソタイプAb(5mg/kg i.p.)を用いて処理した。治療中、DOC-2Abで処置した霊長類は、コントロールとは対照的に、体重の安定化、さらに神経学的欠陥の低下を示した。別の実験において、ここで該疾患のピーク時に抗体の適用を開始すると、コントロール動物とは対照的に、致死的な進行性EAEに対して有意な長期の生存期間を示し得た。

#### 【0081】

要約すると、本明細書の関連において確立したデータは、インビボでCCR2+、GR1+炎症性単球を枯渇した抗体が、MSのマウスモデルおよび霊長類モデルならびに関節炎マウスモデルの両方において明らかな治療効果を提示したことを示す初めてのものである。

#### 【0082】

FACS分析：EDTAを用いる抗凝集処理した全血液または脾臓細胞各々を、直接標識化または標識していない抗体を用いて45分間氷上でインキュベートし、その後3回洗浄して除去した。ネズミ細胞に対する直接標識化抗体(色素FITC、PE、PE-Cy5、APCで標識化した)：CD11b、GR1、CD4、CD19、CD45、DX5、IgE(全てBD-Pharmingenから)に対する抗体を使用した。単球を、そのフォワード・サイドワード分散に基づいて同定し、およびCD11bのその発現に基づいて同定し、およびGr1+およびGR1単球としてGr1の発現によって分類した。

#### 【0083】

直接的に標識されていない抗体として、CCR2抗体MC-21(5  $\mu$ g/ml)またはラットIgG2b-アイソタイプコントロール抗体(5  $\mu$ g/ml、BD-Pharmingen)各々、続いてビオチン化マウス抗ラットIgG2b(5  $\mu$ g/ml、BD-Pharmingen)、続いて10%ラット血清、続いてストレプトアビジン-PEまたはストレプトアビジン-PE-Cy5(DakoCytomation)各々を、適切な場合には、さらに標識化抗体を使用した。非標識化抗体DOC-1、DOC-2およびDOC-3または各アイソタイプコントロール(Sigma-Aldrich)に続いて、PE標識化ポリクローナルウサギ抗マウスF(ab)<sub>2</sub>フラグメントに供した(DakoCytomation、R0439)。

#### 【0084】

染色後に、赤血球の溶解物をFACS溶解液により行った(BD-Pharmingen)。FACS分析をBD-PharmingenのFacsCalibur装置で行った。

#### 【0085】

ELISA：培養物上清またはEDTA血漿各々においてIL-6の測定を、BD-Pharmingenから市販ELISA(OptEIA)にて行った。

#### 【0086】

細胞単離/細胞枯渇：ナイーブ好塩基球を、DX-5-磁性ビーズによるマウスの脾臓および骨髓由来のDX-5-陽性細胞の濃縮により単離した(Miltenyi、isolation according to the manual)。次に、DX-5-APCおよびCD45-FITCによる染色を行い、これにより好塩基性顆粒

球 (DX5+, CD45low) をFACS-Sortにより単離した (BD、FACS ARIA)。こうして得られた好塩基性顆粒球の精製度は95%以上であった。

【0087】

好塩基性顆粒球の枯渇のために、抗IgE FITC抗体を用いてインキュベートした開始細胞を洗浄し、次いで抗FITCビーズとインキュベートして、磁性分類により枯渇させた (Miltenyi)。枯渇は95%以上であった。

【0088】

コラーゲン誘発関節炎：少なくとも8週齢であったオスDBA/1-マウスを、1日目に完全なフロイントアジュバント中のウシコラーゲン (Sigma, C1188) (100 µg) および21日目に不完全フロイントアジュバント中のコラーゲン (100 µg) を用いて尾部にて皮下的に免疫付与した。臨床的関節炎スコアを各脚に対するスコアを収集して決定し、これを全4足について合計した：脚あたりのスコア：1関節の腫れについては1、少なくとも2つの関節の腫れについては2、全脚の腫れについては3、脚の変形については4。抗体による処置を図面に記載したように行った。

10

【0089】

C57BL/6マウスにおける実験的な自己免疫脳脊髄炎 (EAE)：能動免疫付与のために、6-8週齢マウスを、CFA (完全なフロイントアジュバント) (1mg/mlのマイコバクテリウム結核 (Difco) を用いて富化した) に乳化したMOG<sub>35-55</sub> ペプチド (200 µg)；その後i.v.にて同日および2日後に百日咳毒素 (250ng) を皮下に注射した。EAEの臨床的兆候の出現は、一般的に免疫付与13<sup>th</sup>から18<sup>th</sup>日の間に開始した。次いで、該マウスを、次の基準により一週間に4

20

【0090】

コモン・マーモセット (*Callithrix jacchus*) でのEAEに対して、組換えラットMOGを、完全なフロイントアジュバント (CFA) (600 µl CFA中の50mgMOG) に乳化した。150 µl各の部分においてエマルジョンを、4部位にて背面にて皮下に適用した。2箇所適用部位は、肩の領域であり、残りの2つの部位は骨盤あたりであった。適用前に、身体に対応する部分を剃り、皮膚を消毒した。

30

【0091】

*M. tuberculosis*の代わりに、我々は、低用量のCFA (1mg/ml) でCFA *Mycobacterium butyricum*を使用した。この修飾により、通常非常に効果的であるCFAを、その効果を失わずに弱くした。この「スタート・アップ」免疫刺激は自己免疫反応を誘起するために必要であった。

【0092】

リアル・タイムPCR (RT-PCR)：この目的のために、該動物を屠殺し、該骨髄を新たに採取し、直ぐに滅菌PBSで洗った。全RNAを、製造者プロトコールに従ってトリアゾール試薬により単離し、cDNAに転写し、RT-PCRを行った。

【0093】

組織学：マウスをCO<sub>2</sub>により屠殺した。脊柱を取り出して、10%のホルマリン緩衝液に浸した。固定化の後、骨髄を取り出し、埋め込んで、白血球浸潤を推定するためにH&Eを用いるかまたはミエリン化繊維を明示するためにLuxol fast blue (LFB)を用いて染色した。他の免疫組織化学的染色は様々な血液の細胞型を包含した (マクロファージとしてMAC-3：BD Pharmingen；T細胞としてCD3：Serotec、Duesseldorf)。

40

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】単球枯渇の速度論。MC-21またはアイソタイプコントロール抗体各々の毎日投与 (10 µg) は、少なくとも5日間にマウス末梢血からのGR1+ 単球の枯渇を導く。グループあたり5匹のマウスを試験した。血液の消退は、抗体注射約7時間後におきた。GR1+単球と

50

CD19+B 細胞(抗体処置により本質的に影響されない)の比率を基にして、MC-21抗体によるGR1+単球の枯渇を認識できる、これは少なくとも5日間持続する。日、Tag

【図2】高濃度で、MC-21はIL-6の放出を誘導した。C57BL/6-マウスを、100 µgまたは10 µgのMC-21抗体を用いて腹腔内的に処置した。注射2時間後、血漿中のIL-6レベルをELISAにより(酵素結合免疫吸着法)測定した。高用量でのみ、該MC-21抗体はIL-6を放出させた。抗CCR2、MC-21抗体;i.p.、腹腔内。

【図3】3A.様々なMC-21濃度により、関節炎の経過は示差的に変調した。コラーゲン誘発関節炎のモデルにおいて(一日目に完全なフロイントのアジュバント中および21日目に不完全なフロイントのアジュバント中の各々において100 µgコラーゲンをを用いるDBA/1マウスの免疫付与)、高用量MC-21抗体(50 µg)の毎日投与(21-32日間)により、関節炎が明らかに悪化する一方、低用量(10 µg)でのMC-21毎日投与により関節炎が明らかに改善した。3 B.MC-21抗体(抗CCR2)(10-20 µg/日 i.p.)の毎日の低用量投与はまた、関節炎がすでに明らかに進行していた場合にも、コラーゲン誘発関節炎モデルにおいて治療上有効であった。マウスをコラーゲン(完全または不完全なフロイントのアジュバント各々において200 µg)を用いて3週間の間隔で2回投与した。関節炎(スコア3)の明確な徴候の出現後までに、該抗体処置を開始した(0日)。MC-21の投与は該疾患の停止をもたらすが一方で、コントロール群(MC-67の投与)において該疾患は明らかに進行した。MC-21およびMC-67群の間の相違は有意であった( $p < 0.05$ 、日数1-6の間)。0日から計算した関節炎の増加は、MC-67群内で非常に有意であった。MC群内において、関節炎の変化は有意でなかった。

【図4】炎症性単球の枯渇は、多発性硬化症の動物モデルとして実験的な自己免疫脳脊髄炎(EAE)の経過を改善した。20 µgのMC-21の適用は、該アイソタイプコントロール(IgG2b)ではなく、該疾患の経過を有意に改善した。MC-21抗体または該アイソタイプコントロールを、17日(疾患のピーク)から開始して免疫付与後34日まで毎日投与した。2.5の重症度(スコア)の臨床的程度は、後脚の片側麻痺を伴う併発における後脚の明らかな衰弱に相当する。1.0のスコアは、後脚の力/運動機能が保持されている場合の尾部麻痺に相当する。毎日、Taeglich; 臨床的EAEスコア、klinischer EAE-Score; 免疫付与後の日数、Tage nach Immunisierung。

【図5】免疫付与後35日、MC-21で処理したマウスにおけるEAE期間のミエリンへの軽度の損傷。脱髓の定量。MC-21処理した動物はミエリンを、明らかにより多く保存していた。IgG2b、アイソタイプコントロール; 脱髓、Demyelinisierung。

【図6】アイソタイプコントロール抗体(5 mg/kg体重各々)の注射とは対照的に、抗体DOC-2およびDOC-3の注射により、コモン・マーモセットの末梢血中のCCR2-陽性単球数が低下した。白血球の総数を参照して、CCR2-陽性単球の相対的な比率を示し、この値を各日数について、アイソタイプコントロール抗体で処置された群における100%に対して正規化した。CCR2<sup>+</sup>末梢血単球、CCR2 positive Monozyten im peripheren Blut; 0 hに注射した抗体、injizierter Antikoerper bei 0 h; アイソタイプコントロール、Isotypkontrolle。

【図7】非ヒト霊長類における炎症性単球の枯渇は、体重の安定化(A.)に加え神経学的欠損(B.)の低下をもたらす。成体メスのマーモセット(Callithrix jacchus)を、抗ヒトCCR2抗体DOC-2およびアイソタイプ抗体(IgG1)(5 mg/kg i.p.)各々を用いて処理した。抗体の適用を、最初の明白な神経学的症状が動物に現れた直後に開始した。その後、該マーモセットを2日毎に処理した。

【図8】該処置を該疾患のピーク時に開始した場合に、抗ヒトCCR2抗体の治療的投与により寿命が有意に延びた。成体メスのマーモセット(Callithrix jacchus)を、該疾患のピーク時に開始してその後死亡するまで2日毎に、抗ヒトCCR2抗体DOC-2(抗CCR2、5 mg/kg i.p.、n=2)およびPBS (n=2)各々を用いて処置した。

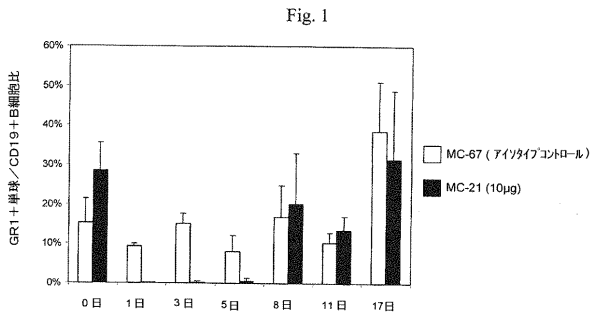
10

20

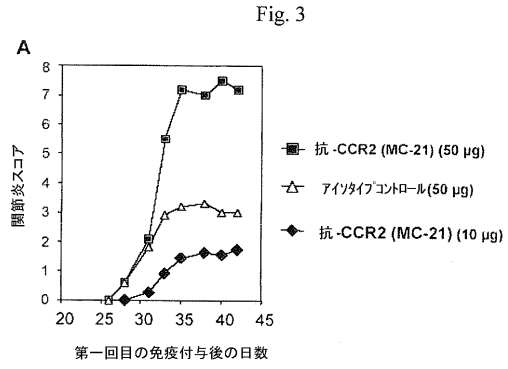
30

40

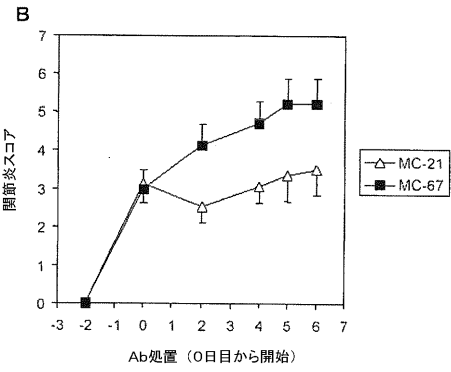
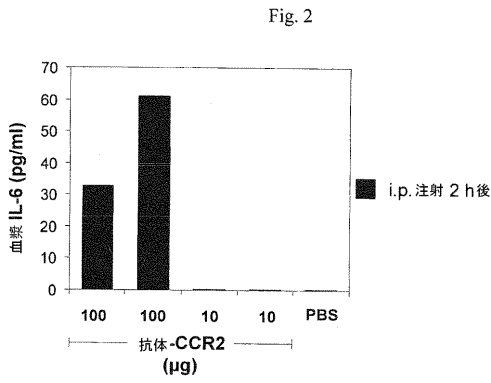
【 図 1 】



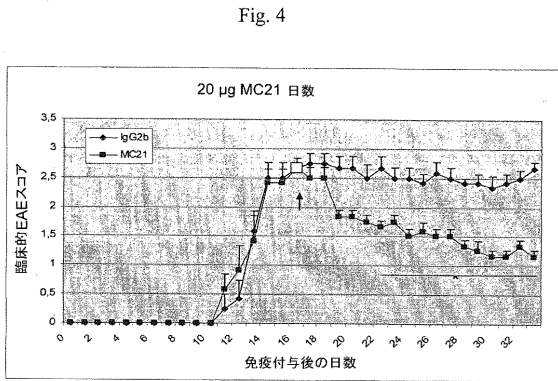
【 図 3 】



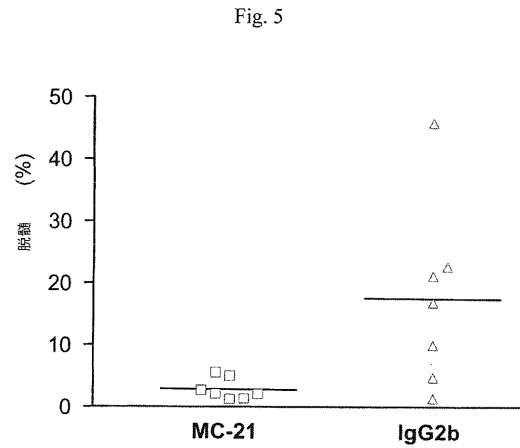
【 図 2 】



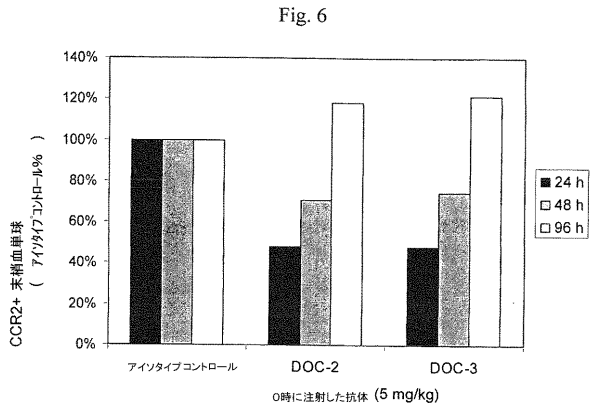
【 図 4 】



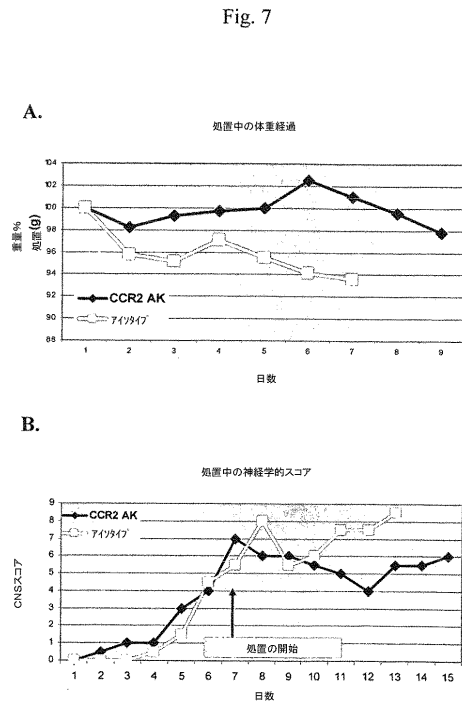
【 図 5 】



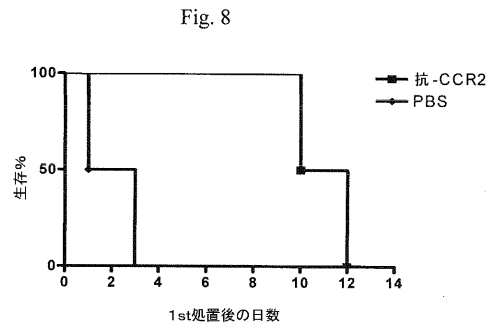
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/002929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/31949 A (PHARMACIA & UPJOHN AB [SE]; CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; LIND) 4 September 1997 (1997-09-04)  page 7, line 7 - page 8, line 8 page 9, lines 4,5 page 10, lines 7-12 page 10, lines 16,17	1-4, 10-13, 15-19, 26,27
X	WO 00/05265 A (LEUKOSITE INC [US]; LAROSA GREGORY J [US]; HORVATH CHRISTOPHER [US]; N) 3 February 2000 (2000-02-03)  page 4, lines 18-21 page 9, lines 11-16 page 46, line 34 - page 47, line 27  -/--	1-4, 10-13, 15-18, 26,27
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  12 July 2007		Date of mailing of the international search report  17/08/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Irion, Andrea

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2007/002929

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 01/57226 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; LAROSA GREGORY J [US]; HORVATH CHRISTOPHER) 9 August 2001 (2001-08-09)</p> <p>page 3, lines 12-27 page 50, lines 1-3 page 69, line 24 - page 70, line 19 claims 79,80</p>	1-4, 10-13, 15-18, 26,27
X	<p>WO 2005/060368 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; O'KEEFE THERESA [US]; PONATH PAUL [US]) 7 July 2005 (2005-07-07)</p> <p>page 3, lines 17-22 page 53, lines 1-3 page 71, line 29 - page 72, line 27 page 50, lines 21-30 page 77, lines 11-13</p>	1-13, 15-27
A	<p>BRUEHL HILKE ET AL: "Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: Evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 172, no. 2, January 2004 (2004-01), pages 890-898, XP002442229 ISSN: 0022-1767 cited in the application the whole document</p>	1-27
A	<p>MARLON P QUINONES ET AL: "The complex role of the chemokine receptor CCR2 in collagen-induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE ;, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 83, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 672-681, XP019320389 ISSN: 1432-1440 the whole document</p>	1-27
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/EP2007/002929

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHNEIDER M ET AL: "In vitro and in vivo properties of a dimeric bispecific single-chain antibody IgG-fusion protein for depletion of CCR2+ target cells in mice" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 35, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 987-995, XP002393135 ISSN: 0014-2980 abstract page 988, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 2 figure 4 page 992, right-hand column, paragraph 2	14
P,X	BRÜHL, H. ET AL.: "Pro- and antiinflammatory functions of CCR2 in collagen-induced arthritis" ZEITSCHRIFT FÜR RHEUMATOLOGIE, vol. 65, no. Suppl.1, 2006, page S77, XP002442230 abstract	1-27
P,X	VERGUNST CLARISSA E ET AL: "Modulation of rheumatoid arthritis by targeting the CCR2 axis: Results of a randomized, placebo-controlled trial with Anti-CCR2 blocking antibodies." ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 54, no. 12, December 2006 (2006-12), page 4037, XP009086466 & 70TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN-COLLEGE-OF-RHEUMATOLOG Y/41ST ANNUAL SCIENTIFIC MEETIN; WASHINGTON, DC, USA; NOVEMBER 10 -15, 2006 ISSN: 0004-3591 abstract	1-27
A	BRODMERKEL CARRIE M ET AL: "Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 175, no. 8, October 2005 (2005-10), pages 5370-5378, XP002442231 ISSN: 0022-1767 the whole document	

-/--

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2007/002929

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MACK M ET AL: "Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 166, no. 7, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 4697-4704, XP002393136 the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2007/002929
--

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  

**Although claims 15-25 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/002929

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9731949	A	04-09-1997	AT 258560 T	15-02-2004			
			AU 724037 B2	07-09-2000			
			AU 2110497 A	16-09-1997			
			DE 69727382 D1	04-03-2004			
			DE 69727382 T2	04-11-2004			
			DK 914345 T3	10-05-2004			
			EP 0914345 A1	12-05-1999			
			ES 2210496 T3	01-07-2004			
			JP 2000510685 T	22-08-2000			
			PT 914345 T	31-05-2004			
			US 6084075 A	04-07-2000			
			WO 0005265	A	03-02-2000	AU 764825 B2	28-08-2003
						AU 5220899 A	14-02-2000
CA 2336250 A1	03-02-2000						
EP 1098908 A2	16-05-2001						
JP 2002521021 T	16-07-2002						
US 6312689 B1	06-11-2001						
US 6352832 B1	05-03-2002						
US 2002037285 A1	28-03-2002						
US 2002150570 A1	17-10-2002						
US 2002051781 A1	02-05-2002						
US 2003165494 A1	04-09-2003						
US 2002028436 A1	07-03-2002						
US 2002015700 A1	07-02-2002						
US 2002012664 A1	31-01-2002						
US 2002051782 A1	02-05-2002						
WO 0157226	A	09-08-2001	AU 3327701 A	14-08-2001			
			CA 2399080 A1	09-08-2001			
			EP 1255844 A1	13-11-2002			
			JP 2003521927 T	22-07-2003			
			MX PA02007449 A	14-04-2003			
WO 2005060368	A	07-07-2005	AU 2003300896 A1	14-07-2005			
			CA 2529694 A1	07-07-2005			
			EP 1631311 A2	08-03-2006			
			MX PA06000176 A	27-06-2006			

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/002929

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
INV. C07K16/28 A61P37/00	A61K39/395 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00	
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Forscherteiler Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07K		
Forscherteiler, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	
	Betr. Anspruch Nr.	
X	WO 97/31949 A (PHARMACIA & UPJOHN AB [SE]; CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; LIND) 4. September 1997 (1997-09-04)  Seite 7, Zeile 7 - Seite 8, Zeile 8 Seite 9, Zeilen 4,5 Seite 10, Zeilen 7-12 Seite 10, Zeilen 16,17	1-4, 10-13, 15-19, 26,27
X	WO 00/05265 A (LEUKOSITE INC [US]; LAROSA GREGORY J [US]; HORVATH CHRISTOPHER [US]; N) 3. Februar 2000 (2000-02-03)  Seite 4, Zeilen 18-21 Seite 9, Zeilen 11-16 Seite 46, Zeile 34 - Seite 47, Zeile 27  -/-	1-4, 10-13, 15-18, 26,27
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		
*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		
*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist		
*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden		
*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist		
*&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
12. Juli 2007	17/08/2007	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Irion, Andrea	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
 PCT/EP2007/002929

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/57226 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; LAROSA GREGORY J [US]; HORVATH CHRISTOPHER) 9. August 2001 (2001-08-09)  Seite 3, Zeilen 12-27 Seite 50, Zeilen 1-3 Seite 69, Zeile 24 - Seite 70, Zeile 19 Ansprüche 79,80	1-4, 10-13, 15-18, 26,27
X	WO 2005/060368 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; O'KEEFE THERESA [US]; PONATH PAUL [US]) 7. Juli 2005 (2005-07-07) Seite 3, Zeilen 17-22 Seite 53, Zeilen 1-3 Seite 71, Zeile 29 - Seite 72, Zeile 27 Seite 50, Zeilen 21-30 Seite 77, Zeilen 11-13	1-13, 15-27
A	BRUEHL HILKE ET AL: "Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: Evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 172, Nr. 2, Januar 2004 (2004-01), Seiten 890-898, XP002442229 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-27
A	MARLON P QUINONES ET AL: "The complex role of the chemokine receptor CCR2 in collagen-induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE ;, SPRINGER-VERLAG, BE, Bd. 83, Nr. 9, 1. September 2005 (2005-09-01), Seiten 672-681, XP019320389 ISSN: 1432-1440 das ganze Dokument	1-27
	----- -/--	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/002929

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>SCHNEIDER M ET AL: "In vitro and in vivo properties of a dimeric bispecific single-chain antibody IgG-fusion protein for depletion of CCR2+ target cells in mice"            EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE,            Bd. 35, Nr. 3, März 2005 (2005-03), Seiten 987-995, XP002393135            ISSN: 0014-2980            Zusammenfassung            Seite 988, linke Spalte, Absatz 1 - Absatz 2            Abbildung 4            Seite 992, rechte Spalte, Absatz 2</p>	14
P,X	<p>BRÜHL, H. ET AL.: "Pro- and antiinflammatory functions of CCR2 in collagen-induced arthritis"            ZEITSCHRIFT FÜR RHEUMATOLOGIE,            Bd. 65, Nr. Suppl.1, 2006, Seite S77,            XP002442230            Zusammenfassung</p>	1-27
P,X	<p>VERGUNST CLARISSA E ET AL: "Modulation of rheumatoid arthritis by targeting the CCR2 axis: Results of a randomized, placebo-controlled trial with Anti-CCR2 blocking antibodies."            ARTHRITIS &amp; RHEUMATISM,            Bd. 54, Nr. 12, Dezember 2006 (2006-12), Seite 4037, XP009086466            &amp; 70TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN-COLLEGE-OF-RHEUMATOLOG Y/41ST ANNUAL SCIENTIFIC MEETIN; WASHINGTON, DC, USA; NOVEMBER 10 -15, 2006            ISSN: 0004-3591            Zusammenfassung</p>	1-27
A	<p>BRODMERKEL CARRIE M ET AL: "Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344"            JOURNAL OF IMMUNOLOGY,            Bd. 175, Nr. 8, Oktober 2005 (2005-10), Seiten 5370-5378, XP002442231            ISSN: 0022-1767            das ganze Dokument</p>	

-/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2007/002929

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MACK M ET AL: "Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 166, Nr. 7, 1. April 2001 (2001-04-01), Seiten 4697-4704, XP002393136 das ganze Dokument -----	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2007/002929

## Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl die Ansprüche 15-25 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

## Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/002929

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung			
WO 9731949	A	04-09-1997	AT 258560 T	15-02-2004			
			AU 724037 B2	07-09-2000			
			AU 2110497 A	16-09-1997			
			DE 69727382 D1	04-03-2004			
			DE 69727382 T2	04-11-2004			
			DK 914345 T3	10-05-2004			
			EP 0914345 A1	12-05-1999			
			ES 2210496 T3	01-07-2004			
			JP 2000510685 T	22-08-2000			
			PT 914345 T	31-05-2004			
			US 6084075 A	04-07-2000			
			WO 0005265	A	03-02-2000	AU 764825 B2	28-08-2003
						AU 5220899 A	14-02-2000
CA 2336250 A1	03-02-2000						
EP 1098908 A2	16-05-2001						
JP 2002521021 T	16-07-2002						
US 6312689 B1	06-11-2001						
US 6352832 B1	05-03-2002						
US 2002037285 A1	28-03-2002						
US 2002150570 A1	17-10-2002						
US 2002051781 A1	02-05-2002						
US 2003165494 A1	04-09-2003						
US 2002028436 A1	07-03-2002						
US 2002015700 A1	07-02-2002						
US 2002012664 A1	31-01-2002						
US 2002051782 A1	02-05-2002						
WO 0157226	A	09-08-2001	AU 3327701 A	14-08-2001			
			CA 2399080 A1	09-08-2001			
			EP 1255844 A1	13-11-2002			
			JP 2003521927 T	22-07-2003			
			MX PA02007449 A	14-04-2003			
WO 2005060368	A	07-07-2005	AU 2003300896 A1	14-07-2005			
			CA 2529694 A1	07-07-2005			
			EP 1631311 A2	08-03-2006			
			MX PA06000176 A	27-06-2006			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 508298444

クリニクム・デア・ユニヴェルジテート・レーゲンスブルク・アンシュタルト・デス・エッフエン  
トリヒェン・レヒツ

KLINIKUM DER UNIVERSITAET REGENSBURG Anstalt  
des oeffentlichen Rechts

ドイツ連邦共和国デー - 9 3 0 5 3レーゲンスブルク、フランツ - ヨゼフ - シュトラウス - アレー  
1 1 番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 マルコ・プリンツ

ドイツ連邦共和国デー - 3 7 0 8 3ゲッティンゲン、シュテューゲミュレンヴェーク 8 番

(72)発明者 ヴォルフガング・ブリュック

ドイツ連邦共和国デー - 3 7 1 2 4ロスドルフ、ホールヴェーク 1 8 番

(72)発明者 アレクサンダー・ミルトナー

ドイツ連邦共和国デー - 3 7 0 7 5ゲッティンゲン、エミリーンシュトラッセ 9 番

(72)発明者 マティアス・マック

ドイツ連邦共和国デー - 9 3 0 5 1レーゲンスブルク、カイザー - フリードリッヒ・アレー 2 1 ベ  
ー番

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB50 CC03 EE01 GG02 GG04 GG06