



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0074787
(43) 공개일자 2009년07월07일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 11/00</i> (2006.01)
 <i>A61P 11/06</i> (2006.01) <i>A61P 1/16</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7008746
 (22) 출원일자 2007년10월05일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2009년04월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/080542
 (87) 국제공개번호 WO 2008/060783
 국제공개일자 2008년05월22일
 (30) 우선권주장
 60/828,253 2006년10월05일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 센토코 오르토 바이오테크 인코포레이티드
 미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브
 800/850</p> <p>(72) 발명자
 다스 애녹
 미국 펜실베이니아주 19312 버윈 버윈-파울리 로
 드 1307
 머레이 린
 미국 펜실베이니아주 19406 킹 오브 프러셔 크루
 키드 레인 733
 시에드 파흐레트
 영국 에식스 씨엠1 6비디 첼름스퍼드 볼리의 파크
 빌러스 체이스 13</p> <p>(74) 대리인
 이은선, 최규팔</p> |
|---|---|

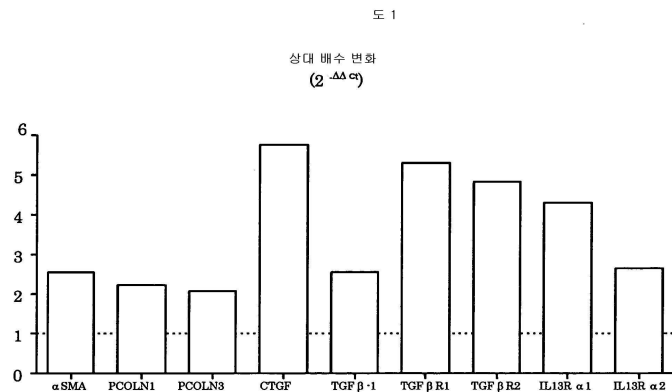
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 섬유증 치료용 CCR2 길항제

(57) 요약

예를 들어, 비제한적으로 콜라겐 기질 침착 및 폐포 허탈을 포함하는 섬유성 과정과 관련된 전섬유성 마커의 조절을 위한 항-MCP-1/CCR2 길항제 치료법을 포함하는 항-MCP-1/CCR2 길항제 치료법이 섬유증 관련 질환의 조절 또는 역행을 위해 제공된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

MCP-1 억제 유효량의 적어도 하나의 MCP-1 길항제를 투여하는 것을 포함하여, 적어도 하나의 MCP-1 길항제를 사용함으로써 적어도 한 형태의 섬유증을 갖는 환자에서 적어도 하나의 인간 단핵구 화학주성 단백질-1 (MCP-1)을 억제하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, MCP-1 길항제가 소분자 및 단백질로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 소분자가 CCR2B에 대한 CCL2 결합을 차단하거나 CCR1 또는 CCR2 자체를 억제하는 능력을 지닌 인돌 유도체, 사이클릭 아민 유도체, 우레이도 유도체, 헤테로사이클릭, 아닐라이드 또는 기능성 피롤로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 단백질이 가용성 수용체, 항체, 펩티드, 이의 단편, 또는 이의 융합 단백질로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 단백질이 단백질의 혈청 반감기를 증가시키는 화합물 또는 단백질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 항체가 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역을 포함하며, 상기 MCP-1 항체는 서열 번호 27 및 28을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 모두를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서, 항체가 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 서열 번호 6, 7, 9, 13, 14 및 16의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열 모두를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 4항에 있어서, 항체가 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역을 포함하며, 상기 MCP-1 항체는 서열 번호 27 및 28을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 모두를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 4항에 있어서, 항체가 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 서열 번호 6, 7, 9, 13, 14 및 16의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열 모두를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 4항에 있어서, 항체가 서열 번호 6, 7, 9, 13, 14 및 16의 적어도 하나의 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄 CDR를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 4항에 있어서, 항체가 서열 번호 6 내지 26으로 구성된 그룹으로부터 선택된 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간

드 결합 부분의 상보성 결정 영역 (CDR)을 추가로 포함하며; 임의로 인간 면역글로불린의 적어도 CH1, 힌지, CH2, 또는 CH3를 추가로 포함하는, 임의로 프레임워크 영역과 기능적으로 관련된 서열 번호 2 내지 5 중 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 4항에 있어서, 항체가 적어도 10^{-9} M, 적어도 10^{-10} M, 적어도 10^{-11} M, 또는 적어도 10^{-12} M로부터 선택된 적어도 하나의 친화도로 MCP-1과 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 4항에 있어서, 상기 항체가 적어도 하나의 MCP-1 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 실질적으로 조절하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 소분자 또는 단백질이 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는 조성물로 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 검출가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항-감염제, 심혈관(CV)계 약물, 중추신경계 (CNS) 약물, 자율신경계 (ANS) 약물, 기도 약물, 위장 (GI) 관 약물, 호르몬제, 유체 또는 전해질 균형을 위한 약물, 혈액약, 항신생물제, 면역조절제, 눈, 귀 또는 코 약물, 국소 약물, 영양제, 사이토카인 또는 사이토카인 길항제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물 또는 폴리펩티드를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서, 억제 유효량이 세포, 조직, 기관, 또는 동물 kg 당 0.001-50 mg인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서, 투여가 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 낭내, 연골사이, 공동내, 강내, 뇌내, 뇌실내, 대장내, 경부내, 위내, 간내, 심장 근육내, 골내, 골반내, 심막내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 결장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활액내, 흉곽내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질, 결장, 협측, 설하, 비내, 또는 경피로부터 선택된 적어도 하나의 방식에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1항에 있어서, 섬유증이 기관 특이적 섬유증 또는 전신 섬유증인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 기관 특이적 섬유증이 폐 섬유증, 간 섬유증, 신장 섬유증, 심장 섬유증, 혈관 섬유증, 피부 섬유증, 눈 섬유증, 골수 섬유증 또는 다른 섬유증 중 적어도 하나와 관련된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 폐 섬유증이 약물 유도된 폐 섬유증, 천식, 사르코이도시스 또는 만성 폐쇄성 폐 질환 중 적어도 하나와 관련된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 19항에 있어서, 간 섬유증이 경화증, 주혈흡충증(schistosomiasis), 또는 담관염 중 적어도 하나와 관련된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 경화증이 C형 간염-후 경화증, 원발성 담즙성 간경화증으로부터 선택되는 것을 특징으로 하

는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 담관염이 경화성 담관염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 19항에 있어서, 신장 섬유증이 루프스 사구체경화증(lupus glomerulosclerosis)과 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 19항에 있어서, 심장 섬유증이 심근경색증 중 적어도 하나의 타입과 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 19항에 있어서, 혈관 섬유증이 혈관형성술후 동맥 재협착 또는 죽상경화증 중 적어도 하나와 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 19항에 있어서, 피부 섬유증이 켈로이드 또는 신원성 섬유화 피부병 중 적어도 하나와 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 19항에 있어서, 눈 섬유증이 안구-후방 섬유증, 백내장후(postcataract) 수술 또는 증식성 유리체망막병증 중 하나와 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 19항에 있어서, 골수 섬유증이 특발성 골수섬유증 또는 약물 유도된 골수섬유증 중 적어도 하나와 관련되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 19항에 있어서, 다른 섬유증이 페로니병, 뒤피트렌구축 또는 피부근육염으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 18항에 있어서, 전신 섬유증이 전신 경화증 및 이식편 대 숙주 질환으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

본원에 기술된 임의의 발명.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 폐 섬유증, 특히 통상형 간질폐렴의 예방 및 조절을 위한 항-CCL2 항체와 같은 CCR2에 대한 CCL2 결합 길항제 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 통상형 간질폐렴 (UIP)은 통상적으로 폐 내에 벌집 모양의 존재를 특징으로 하며 이에 의하여 진단되는 만성 쇠약 간질폐 질환이다. 콜라겐 침착이 증가하고, 이에 따라 폐 내에 탄력성이 줄어들고, 정상 파리 구조의 최종 의 허탈 및 뒷당김이 유발되기 때문에 벌집 모양이 생긴다. 벌집 모양 및 섬유증의 정도는 폐에서 매우 비균일

하고, 여기에서 과도한 콜라겐의 고밀도 영역은 종종 단핵 세포 침윤물에 풍부한 간질 조직 또는 실질 정상 폐에 인접한다. 대부분의 환자는 진단 시에 중등도 내지 진행성 임상 질환을 가지며, 치료에도 불구하고 쇠약해진다.

- <3> CXC 케모카인 패밀리는 다양한 백혈구의 트래픽킹(trafficking) 증진, 혈관신생 및 혈관 재형성의 조절 및 폐 섬유증에서 순환하는 중간엽 전구 세포(섬유모세포로도 알려짐)인 섬유증과 같은 중간엽 전구 세포의 트래픽킹 및 가동화의 증진에 수반되는 사이토카인의 다면 발현성 패밀리이다.
- <4> 정상 폐 내에서, 큰 풀(pool)의 잔류하는 섬유모세포가 지속적으로 콜라겐을 생성하고 분해시켜, 감염, 염증 또는 다른 병태생리 이후 및 손상 이후에 폐가 재형성되도록 한다. 섬유모세포는 TGFβ1과 같은 다양한 성장 인자에 대한 반응으로 콜라겐을 생성한다. 또한, TGFβ1은 근육섬유모세포로의 섬유모세포의 분화를 유도하며, 이는 UIP 폐 조직에서 일반적으로 발견된다. 근육섬유모세포는 콜라겐을 생성할 수 있고, 알파-평활근 액틴을 가져, 수축 특성을 갖는 분화된 세포이다. 따라서, 근육섬유모세포는 잠재적으로 파리 허탈에 기여할 수 있다. 상처 치유의 정상적 경로에서, 섬유모세포는 상처 메움을 지시하기 위하여 콜라겐 및 성장 인자를 생성한다. 조직 구조가 복원되면, 섬유모세포 콜라겐 생성이 감소되고, 세포는 세포자멸사를 통해 진행되어, 과도한 흉터 형성이 예방된다. 명백한 섬유모세포 증식이 UIP 환자의 폐에서 관찰된다. 따라서, UIP 섬유모세포는 계속적으로 비정상적 과도한 콜라겐 침착에 첨가되는 섬유증의 부위에서 지속된다. UIP 환자는 폐 이식편 공통의 이식편수령자 중 하나이며, 이들 환자에서, 이식편은 결국 섬유증이 될 수 있다.
- <5> 이전의 연구는 비-섬유증 조직으로부터 분리된 섬유모세포와 비교하여, 섬유증의 부위로부터 분리된 섬유모세포의 표현형 차이를 나타내었다. 예를 들어, UIP 환자의 폐로부터 분리된 섬유모세포에서 IL-13 수용체 서브유닛의 발현이 증가된다. CCR2는 폐 섬유증에서 발현되며, CCR2는 호흡 손상 이후, 이들 세포의 동원 및 활성화 둘 모두를 조절한다. 수용체 녹아웃(knockout) 마우스 또는 리간드 중화를 통한 생체 내에서의 CCR2 신호의 억제는, 섬유증의 다중 동물 모델에서 콜라겐 침착을 덜 유발한다. CCL2 (CC-케모카인 리간드 2, 단핵구 화학주성 단백질 1, MCP1)는 CCR2에 결합한다. CCR2는 단핵구, 상피 세포 및 내피 세포에서 우세하게 발현된다. UIP를 지닌 환자에서 증가된 MCP1의 수준이 기술되었다. 마우스에서 CCR2 수용체에 대한 리간드는 CCL2 (JE 또는 단핵구 화학주성 단백질 [MCP]-1으로도 알려짐), CCL7 (MCP-3) 및 CCL12 (MCP-5)를 포함하여, 무린 모델 데이터에 기초한 가정이 케모카인 및 케모카인 수용체 분포에 관한 인간 폐 환경을 정확하게 반영하지 않을 수 있다.
- <6> 76개 아미노산 잔기를 함유하는 8.6 kDa 단백질인 단핵구 화학주성 단백질 1 (MCP-1, CCL2, CCR2에 대한 리간드, GenBank NP_002973)은 사이토카인의 케모카인-베타 (또는 C-C) 패밀리의 구성원이다. MCP-1은 단핵구, 혈관 내피 세포, 평활근 세포, 사구체 혈관사이 세포, 골모 세포 및 인간 폐 2-형-유사 내피 세포를 포함하는 다양한 세포 유형에서 발현된다. MCP-1은 조직에서 단핵구 유입을 증진시키고 이후의 활성화에 의하여 염증 질환의 개시 및 진행에서 활성적인 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. MCP-1은 호중구가 아닌 단핵구에 대하여 화학주성이다. 이는 CHAK (CC-케모카인 활성화된 살해)로도 알려진 살해 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있으며, 이는 IL-2에 의해 활성화되는 세포와 유사하다. 이는 세포 표면 항원 (CD11c, CD11b)의 발현 및 사이토카인 IL1 및 IL6의 발현을 조절한다. MCP-1은 히스타민의 탈과립 및 방출을 유도하는 인간 호염기구의 유력한 활성화제이다.
- <7> 따라서, UIP로 알려진 폐 기능부전을 유발하는 병태생리 특징을 나타내는 환자를 모니터하고 관리하며, 폐 이식에 대한 필요를 피할 수 있고, 최소한도의 동종이식 사용에서 안정성 및 생존을 증진시키며, 거기에 MCP-1의 병리적 활동을 이해하고 치료하는 방법을 위한 의학적 기술이 필요하다.

발명의 상세한 설명

- <8> 발명의 요약
- <9> 본 발명은 본원에 정의된 수용체를 나타내는 세포에서, CCR2, 그의 아형(isoform), 또는 CCR2A 또는 CCR2B를 포함하는 변이체와 관련된 생물학적 기능 또는 생물활성을 방지하는 적어도 하나의 분리된 CCR2 길항제 또는 포유 동물 대상의 세포, 조직, 기관에서 MCP-1/CCL2 또는 CCR2에 결합하거나, CCR2와 그의 동족체 리간드(들)의 결합을 억제하고, 이에 따라 CCR2 생물학적 기능을 억제하는 길항제의 유효량을 포함하는 조성물을 접촉시키거나 투여하는 것을 포함하여, 대상에서 섬유증을 예방, 지연, 또는 역행시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법의 일면에서, 대상은 간질성 병리 및 간질성 특발 폐렴과 관련된 파리 섬유증을 갖는 환자이며, 더욱 자세하게, 환자는 통상형 간질폐렴으로 진단된다.
- <10> 본 발명의 방법은 본원에 정의된 수용체를 나타내는 세포에서, CCR2, 그의 아형, 또는 CCR2A 또는 CCR2B를 포함

하는 변이체와 관련된 생물학적 기능 또는 생물활성을 방지하는 CCR2 길항제를 사용하여 실시될 수 있다. 본 발명의 일 면에서, CCR2 길항제는 MCP-1/CCL2 또는 CCR2에 결합하거나, CCR2와 그의 동족체 리간드(들)의 결합을 방지하여, CCR2 생물학적 기능을 억제하는 항체, 합성 또는 천연 서열 펩티드 및 소분자 길항제를 포함한다.

- <11> 세포, 조직, 기관, 또는 동물에서 MCP-1 관련 간질성 병리 및 간질성 특별 폐렴과 관련된 파리 섬유증을 진단하는 방법도 제공된다.
- <12> 일 구체예에서, 항체의 리간드 결합 부분은 서열 번호 27 및 28을 포함한다. 일 면에서, 본 발명은 서열 번호 27 또는 28을 포함하는 적어도 하나의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 분리된 포유 동물 항-MCP-1 항체를 포함한다.
- <13> 또다른 면에서, 본 발명은 (i) 서열 번호 6, 7 및 9의 중쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열 모두; 또는 (ii) 서열 번호 13, 14 및 16의 경쇄 CDR 아미노산 서열 모두를 포함하는 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-MCP-1 항체를 제공한다.
- <14> 본 발명은 본 분야에 알려지고/거나 본원에 기술된 관련 증상 이전, 이후 또는 도중에, 및/또는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 적어도 하나의 MCP-1 관련 증상을 조절하거나 치료하기 위한 치료적 유효량을 투여하기 위한 적어도 하나의 항-MCP-1 항체 방법 또는 조성물을 추가로 제공한다. 또다른 면에서, 본 발명은 (i) 서열 번호 6, 7 및 8 또는 9의 중쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열 모두; 또는 (ii) 서열 번호 13, 14 및 15 또는 16의 경쇄 CDR 아미노산 서열 모두를 포함하는 적어도 하나의 분리된 포유동물 항-MCP-1 항체를 제공한다.
- <15> 본 발명은 또한 본 발명에 따른 적어도 하나의 항-MCP-1 항체의 치료적 또는 예방적 유효량을 전달하는 적어도 하나의 조성물, 장치 및/또는 방법도 제공한다.
- <16> 본 발명은 본원에 기술된 임의의 발명을 추가로 제공한다.

실시예

- <137> 실시예 1: 섬유성 및 비-섬유성 섬유모세포
- <138> 조직병리학적으로 비-섬유성 폐 조직으로부터의 것과 비교하여 UIP 환자로부터의 섬유모세포의 고유의 특성을 특성화하기 위하여, 섬유성 병리학의 공지된 매개자, 이를 테면 TGF베타, PDGF-AB 및 CCL2에 대한 반응으로 및 자극되지 않은 상태에서 하나의 또는 다른 유형의 조직으로부터의 1차 섬유모세포가 마커에 대하여 평가된다.
- <139> 섬유모세포 분리 및 정제
- <140> University of Michigan에서 Dr Cory Hogaboam에 의해 세포주를 제공받았다. 많은 일차 섬유모세포주를 분리하였다. 모든 일차 섬유모세포주를 이전에 기술된 바와 같이 분리하였다 (Hogaboam et al. 1999 J Immunol 163 (4) :2193-201). UIP 환자 (n=4)로부터 취한 폐 생검으로부터 일차 섬유모세포를 분리하였고, 이들은 "섬유성 섬유모세포"로 언급하였다. 또한 폐 종양 절제 (n=5) 도중 취한 폐 조직으로부터 섬유모세포를 분리하고, 이들 샘플을 조직학적 분석으로 비-섬유성인 것으로 확인하였다. 섬유모세포 유래된 이러한 비-섬유성 조직을 "비-섬유성 섬유모세포"로 언급하였다.
- <141> 섬유모세포 유전자 발현
- <142> 인간 폐 섬유모세포를 24 웰 플레이트 (Costar, Corning, NY)에 100,000 세포/웰로 플레이팅하고 8 시간 동안 부착되도록 하였다. 그 다음, 세포를 PBS로 세척하고, 혈청 부재 배지 중에서 밤새 배양하였다 (1-글루타민과 함께 DMEM, 페니실린/스트렙토마이신). 그 다음, TGFb-I (1 또는 10 ng/mL), PDGF-AB (20 또는 200 ng/mL) 또는 CCL2 (1 또는 10 ng/mL)의 존재 또는 부재 하에서 세포를 24 시간 동안 자극시켰다. TGFbI, PDGF-AB 및 CCL2를 R&D Systems로부터 구매하였다. 상층액을 제거하고, 그 다음, 제조자의 지시에 따라 RNeasy Plus Mini-Kits (QIAGEN, Valencia, CA)를 사용하여 RNA를 분리하고, TaqMana 역 전사 시약 (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 실시간 PCR에 의하여 전섬유성 유전자 발현을 결정하고, 제조자의 지시에 따라 Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems)을 예비-발달시켰다. 유전자 발현이 처음 검출된 역치 사이클 수로서 CT 값을 결정하는 비교 CT 방법을 사용하여 정량적 유전자 발현을 계산하였다. 관심 유전자에 대한 유전자 발현의 배수 변화를 먼저 하우스키핑 유전자에 대하여 정규화하고, ΔCT 값을 제공하였다. 섬유성 및 비-섬유성 섬유모세포 사이의 발현의 배수 변화를 계산하였다: ΔCT(비-섬유성) - ΔCT(섬유성) = ΔΔCT, 상기 식

에서, 비-섬유성 유전자 발현을 교정기로 삼았다. 시험관 내 자극에 기인한 유전자 발현의 배수 변화를 $\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{미자극}) - \Delta CT(\text{자극})$ 로 계산하였으며, 미자극된 샘플을 교정기로 삼았다. 그 다음, 계산 2- $\Delta \Delta CT$ 는 교정기와 비교하여 최종 배수 변화에 대한 상대 값을 제공한다.

- <143> UIP 섬유모세포 (n=3)에서의 전섬유성 유전자 발현의 기저 발현이 비-섬유성 (n=4) 섬유모세포와 비교하여 상이한지 결정하기 위하여, 환자의 두 코호트 (cohort)로부터의 미자극 세포 사이에 유전자 발현을 비교하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, UIP 환자로부터 유래된 섬유모세포는 모든 분석된 유전자에서 더 큰 기저 섬유성 유전자 발현을 가졌다.
- <144> TGFb1은 비-섬유성 및 섬유성 섬유모세포에서 aSMA를 유도하나, 유도의 세기는 섬유성 섬유모세포에서보다 더 크다 (도 2). PDGF는 aSMA 발현 및 섬유성 섬유모세포에서만 적당한 증가를 유도한다. CCL2는 또한 오직 섬유성 섬유모세포에서 aSMA 발현의 증가를 유도한다.
- <145> UIP 섬유모세포가 증진된 수준의 유전자 발현을 나타내는지 결정하기 위하여, 세포를 CCL2로 자극시켰다. 도 3A 및 B는 UIP 섬유모세포에서 CCL2가 프로콜라겐 I 및 프로콜라겐 III를 둘 다 유도하는 것을 나타낸 것이다. 또한, CCL2에 의한 유전자 유도의 정도는 TGFb1 및 PDGF-AB에 의해 생성된 것과 맞먹는다.
- <146> TGFb1의 전섬유성 역할이 잘 기술되어 있다. TGFb1, PDGF 및 CCL2-유도된 TGFb1 유전자 발현 (도. 4). 자가 분비 루프에 의한 TGFb1 유도는 잘 알려져 있으며, 비-섬유성 및 섬유성 섬유모세포 둘 모두와 함께 현재 데이터에 의하여 지지된다. 이러한 실험은 CCL2가 또한 TGFb1 유전자 발현을 증진시키는 것을 추가로 기술한다. TGFb1에서와 같이, CCL2에 의한 TGFb1 유전자 유도의 정도는 섬유성 섬유모세포에서보다 더 크다.
- <147> TGFb1, PDGF 및 CCL2-유도된 CTGF 유전자 발현 (도 5). TGFb1은 섬유성 및 비-섬유성 섬유모세포에서 CTGF 유전자 발현의 증가를 유도한다. 또한, 저-용량 PDGF 및 CCL2는 UIP 섬유모세포에서 CTGF 유전자 발현의 증가를 유도한다.
- <148> TGFb1, PDGF 및 CCL2-유도된 TGFbRI 및 TGFbRII 두 개의 서브유닛 유전자 발현을 도 6A 및 B에 나타내었다. TGFb1은 TGFbRI에 더 큰 효과를 가지며, CCL2는 TGFbRII에서 다소 더 큰 증가를 유도하였다.
- <149> TGFb1, PDGF 및 CCL2-유도된 IL13Ra1 및 IL13Ra2 유전자 발현을 도 7A 및 B에 나타내었다. TGFb1, PDGF 및 CCL2는 UIP 섬유모세포에서 IL13Ra1 발현을 상향조절시킨다. IL13Ra2를 통한 신호 전달이 TGFb1의 유도를 통하여 전섬유성인 것으로 최근 기술되었다. 모든 세개의 매개자는 IL13Ra2 발현의 상향 조절을 유도하였고, 이에 의해 이들 세포를 잠재적으로 IL-13 매개의 반응에 대해 더 민감하게 하였다.

실시예 2:

- <151> IPF 및 비-섬유성 환자로부터의 폐 조직을 잘게 썰고, 20ml의 배지(DMEM w/15% FCS, 1% PSA, & L-글루타민)를 함유하는 T75cm 조직 배양 플라스크에 두었다. 세포 콜로니가 형성될 때 까지 배지를 주 2회 교환하였다. 세포를 떼어내고 계대하였다. 계대수 5 이후에 실험을 수행하였다.
- <152> RNA 분리
- <153> 24 웰 플레이트의 500 μ l/웰에서 DMEM 15% FCS 1% 글루타맥스, 1% 페니실린 스트렙토마이신 중에 섬유모세포를 밤새 배양하였다. 세포를 혈청 부재의 DMEM 중에서 24 시간 동안 배양하였다. 배지를 인간 혈청 알부민이 보충된 DMEM으로 교환하고, 배양물을 24 및/또는 48 시간 동안 인큐베이션하였다. RNA를 수확하기 위하여, RNeasy mini 키트 (Qiagen, Inc. Valencia, CA)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 배양된 세포를 용해시켰다. RNA의 질 및 양을 2100 Bio Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)로 결정하였다.
- <154> RT-PCR
- <155> TaqMan® 시약 (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 사용하여 역전사 반응을 프로토콜대로 25 °C에서 10분, 48 °C에서 30분, 95 °C에서 5분으로 수행하였다. ABI Prism® 7900 서열 검출 시스템이 장착된 통상적 ABI 저-밀도 분석법 (이중 어세이-온-디맨드(Assays-on-Demand) 프라이머 및 프로브)을 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. AmpliTaq Gold DNA 폴리머라아제 (Applied Biosystems, Foster City, CA)의 존재 하에서, 반응물을 50 °C에서 2분 동안 인큐베이션한 다음 95 °C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 반응물을 사이클마다 95 °C 15초, 60 °C 1분으로 40 사이클 동안 수행하였다. 상대적 정량을 위한 DCT 방법을 사용하여 샘플을 정규화하기 위하여 내인성 대조군 GAPDH를 사용하였다.
- <156> 면역검출

<157> 섬유모세포를 상기 기술된 바와 같이 밤새 배양하였다. LINCplex 인간 사이토카인/케모카인 30plex panel (Millipore), ENA-78 Quantikine 키트 및 IL-13 RA2 ELISA 키트 (R&D systems)를 사용하는 테스트를 위하여 상층액을 엘리쿼트하였다.

<158> 결과:

<159> CXCL5, CCL2, IL13ra2 및 IL-6의 상대 발현을 위해 RT-PCR로 7개의 IPF 폐 섬유모세포주 및 5개의 비-섬유성 폐 섬유모세포주로부터의 cDNA를 24 시간에 평가하였다. 표 1은 비-섬유성 세포주에 대하여 평균 dCt (표적Ct - GAPDHct)에 대하여 각 IPF 세포주를 위한 상대 배수 발현을 나타낸다.

<160> IPF 세포주 126은 CXCL5, IL13ra2 및 IL-6에 대하여 가장 높은 발현을 가진다. CCL2 발현은 7개 세포주 중 6개에 대하여 비-섬유성 세포주에서보다 더 크거나 동급 내지 2-배 더 크다. CXCL5 및 IL6 발현 수준은 5개 세포주에 대하여 비-섬유성 세포주에서보다 더 크거나 동급 내지 2-배 더 크며, IL13ra2 발현은 4개 세포주에 대하여 비-섬유성 세포주보다 크거나 동급 내지 2-배 더 크다.

표 1

세포주 번호/ 유전자	116	122	123	126	138	148	201	중간 배수- 증가
CXCL5	1	2	6	2752	5	22	1	5.18
CCL2	2	2	4	3	4	3	0	3
IL13Ra2	1	1	3	14	4	8	1	
IL6	2	2	2	683	0	8	1	2

<161>

단백질 분석

<162>

<163> 5개의 UIP 세포주 및 5개의 비-섬유성 세포주로부터의 상층액을 ELISA 또는 멀티플렉스에 의하여 IL-6, IL-8, CCL2, CXCL5, G-CSF 및 VEGF의 단백질 발현에 대하여 테스트하였다. 표 2 및 3은 테스트된 모든 세포주에 대한 단백질 수준을 pg/ml로 나타낸 것이다. 섬유성 세포주 148은 IL-6, IL- 8, G-CSF, CCL2 및 VEGF에 대하여 가장 높은 발현 수준을 가진다. 세포주 126은 CXCL5에 대하여 가장 높았다(16430 pg/ml). IL-8 발현은 모든 5개 세포주에 대한 중간 비-섬유성 발현보다 크거나 이와 동급 내지 2 배였다. CCL2 및 IL-6 발현은 5개 세포주 중 4개에 대하여 중간 비-섬유성 발현보다 크거나 동급 내지 2 배였다. G-CSF 발현은 2개 세포주에 대하여 중간 비-섬유성 발현보다 크거나 동급 내지 2 배였다. VEGF 발현은 3개 세포주에 대한 중간 비-섬유성 발현보다 크거나 동급 내지 2 배였다. CXCL5 발현은 2개 세포주에 대하여 중간 비-섬유성 발현(0보다 큰 값에 대하여)보다 크거나 동급 내지 2 배였다. 섬유성 및 비-섬유성 세포주에 대한 중간값의 비교는 섬유성 및 비-섬유성 세포 사이의 중간값 차이의 상대적 세기에서 IL8 > IL6 ≥ CCL2 > VEGF를 나타내었다.

표 2

세포주 번호/단백질	130	131	134	135	139	중간
IL6	10	4	18	63	25	18
IL8	3	4	4	5	37	4
G-CSF	0	0	0	0	0	0
CCL2	265	186	501	914	1506	501
VEGF	2	12	17	8	17	12
CXCL5	0	0	84	0	5	0

<164>

표 3

세포주 번호/단백질	116	117	123	126	148	중간	섬유성/ 비섬유성
IL6	70	43	15	117	5086	70	3.9
IL8	20	25	26	560	3143	26	6.0
G-CSF	0	0	0	71	1457	0	-
CCL2	1675	2050	847	1572	2651	1675	3.3
VEGF	17	26	8	94	712	26	2.2
CXCL5	3	3	77	16430	470	77	-

<165>

<166>

이들 매개체 사이의 관계를 추가로 시험하기 위하여, 섬유성 세포주 126을 각각 서열 번호 27 및 28에 제공된 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성된 CCL2-중화 항체 CNT0888, 또는 비관련 아형 매치된 항체와 함께 처리하고, 유전자 및 단백질 발현 수준을 항체가 존재하지 않는 동일한 세포주와 비교하였다. 유전자 발현에 대한 결과를 표 4에 나타내었으며, 단백질 발현에 대한 결과를 표 5에 나타내었다.

표 4

유전자	처리되지 않은 세포 수준에 대한 퍼센트	
	다른 IgG1	항-CCL2
CXCL5	59	<1
CCL2	106	2
IL13Ra2	82	5
IL6	98	<1

<167>

표 5

단백질	미처리	미처리에 대한 퍼센트			
		다른 IgG1	항-CCL2	다른 IgG1	항-CCL2
IL6	17442	19435	40	111	<1
IL8	13900	15634	308	112	2
G-CSF	10000	10000	1	100	<1
VEGF	774	711	175	100	23
CXCL5	12055	9083	32	75	<1

<168>

<169>

항-CCL2의 존재가 치료법 도중 모니터될 수 있을지라도, CCL2는 항-CCL2 항체 (CNT0888)의 존재 하에서 정확히 측정될 수 없었다. CNT0 888에서 단백질의 가장 큰 배수 감소는 G-CSF였다 (6803 배). 가장 낮은 배수는 VEGF였다 (4 배): G-CSF > IL6 = CXCL5 > IL8 > VEGF

<170>

다수의 시점에서 폐 생검에 의하여 질환 진행도를 모니터링하는 것은 실행 불가능할 것이다. CCL2에 의해 약화된 전섬유성 마커의 패널을 확인하였으며, CCL2 활성을 평가하기 위하여 생체 외에서 측정될 수 있다. 확인된 마커를 대리로 사용하여 치료법 도중 항체 활성을 모니터링하게 하여, 투여량 및 시간과 같은 치료 옵션을 결정하는 데 도움을 받았다. 두번째로, 우리는 전섬유성 유전자/단백질 프로필에 대하여 IPF 폐 섬유모세포의 집단 내에서 큰 세기의 변동성을 결정하였고, 이는 아마도 항-CCL2 치료법에 대한 반응성이 있는 하위 세트의 환자를 나타내는 것일 수 있다. 질환의 대리 마커로서 유전자/단백질의 전섬유성 패널을 사용하여, 질환 진행의 정량적 및 상대적으로 비-침투성인 측정법을 제공하였다.

SEQUENCE LISTING

```

<110> Centocor, Inc., Murray, Lynn; Syed, Farhat; Das, Anuk
5 <120> CCR2 antagonists for TREATMENT OF FIBROSIS
    <130> CEN5158 PCT
    <140> US 60/828,253
10 <141> 2006-10-05
    <160> 28
    <170> PatentIn version 3.3
15 <210> 1
    <211> 76
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
20
    <220>
    <221> VARIANT
    <222> (1)..(1)
25 <223> Xaa may be Gln, Glu, or pyroglutamic acid
    <220>
    <221> VARIANT
    <222> (40)..(40)
30 <223> Xaa may be Ala or Ser
    <220>
    <221> VARIANT
    <222> (41)..(41)
35 <223> Xaa may be Val or Ile
    <220>
    <221> VARIANT
    <222> (43)..(43)
40 <223> Xaa may be Phe or Tyr
    <220>
    <221> SITE
    <222> (69)..(69)
45
    <220>
    <221> SITE
    <222> (75)..(75)
    <223> Conjugate position, e.g. biotin or PEG-biotin
50
<400> 1
Xaa Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15
55
Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30

```

<171>

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Xaa Ile Xaa Lys Thr Ile Val Ala
 5 35 40 45

 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 10 50 55 60

 Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
 15 65 70 75

 15 <210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> human

 20 <220>
 <221> FR1
 <222> (1)..(25)

 25 <220>
 <221> CDR1
 <222> (26)..(35)
 <223> Degenerate

 30 <220>
 <221> FR2
 <222> (36)..(46)
 <223> Degenerate

 35 <220>
 <221> CDR2
 <222> (47)..(66)
 <223> Degenerate

 40 <220>
 <221> FR3
 <222> (67)..(98)

 <220>
 45 <221> CDR3
 <222> (99)..(108)

 <220>
 50 <221> FR4
 <222> (109)..(119)

 <400> 2

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

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 60 20 25 30

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

<172>

Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 5
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 10
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15
 Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 20
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 25
 <210> 3
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Human
 30
 <220>
 <221> FR1
 <222> (1)..(23)
 35
 <220>
 <221> CDR1
 <222> (24)..(35)
 40
 <220>
 <221> FR2
 <222> (36)..(46)
 45
 <220>
 <221> CDR2
 <222> (47)..(57)
 50
 <220>
 <221> FR3
 <222> (58)..(89)
 55
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (90)..(90)
 <223> X may be H or Q
 60
 <220>
 <221> CDR3
 <222> (90)..(97)
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (94)..(94)
 <223> X may be Glu, Gln, Asp, Ser, Thr, or Phe
 <220>

<173>

<221> VARIANT
 <222> (95)..(95)
 <223> X may be Leu, Ile, His, Tyr, Phe, or Gln
 5 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (96)..(96)
 <223> X may be Trp, His, Ser, Proline
 10 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (97)..(97)
 <223> X may be Ala, Val, Asn, Gln, Ser, or Proline
 15 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (98)..(98)
 <223> X may be absent or Phe or Met
 20 <220>
 <221> FR4
 <222> (98)..(109)
 25 <220>
 <221> FR4
 <222> (99)..(109)
 <400> 3
 30 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
 20 25 30
 40 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 45 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 50 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 55 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 60 Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Human

<174>

```

<220>
<221> FR1
<222> (1)..(25)

5 <220>
   <221> CDR1
   <222> (26)..(35)

10 <220>
    <221> FR2
    <222> (36)..(46)

    <220>
    <221> CDR2
    <222> (47)..(66)

15 <220>
    <221> FR3
    <222> (67)..(98)

20 <220>
    <221> CDR3
    <222> (99)..(110)

25 <220>
    <221> FR4
    <222> (111)..(120)

30 <400> 4
   Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
   1      5      10      15
35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
   20      25      30
40 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
   35      40      45
45 Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
   50      55      60
   Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
   65      70      75      80
50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85      90      95
55 Ala Arg Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
   100      105      110
60 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
   115      120

<210> 5

```

<175>

```

<211> 107
<212> PRT
<213> Human

5
<220>
<221> FR1
<222> (1)..(22)

10
<220>
<221> CDR1
<222> (23)..(33)

15
<220>
<221> FR2
<222> (34)..(44)

20
<220>
<221> CDR2
<222> (45)..(55)

25
<220>
<221> FR3
<222> (56)..(87)

30
<220>
<221> CDR3
<222> (88)..(97)

35
<220>
<221> VARIANT
<222> (89)..(89)
<223> Xaa may be Ser or Thr

40
<220>
<221> VARIANT
<222> (91)..(91)
<223> Xaa may be Asp or Thr

45
<220>
<221> VARIANT
<222> (92)..(92)
<223> Xaa may be Arg or Ala

50
<220>
<221> VARIANT
<222> (93)..(93)
<223> Xaa may be Gln or Phe

55
<220>
<221> VARIANT
<222> (96)..(96)
<223> Xaa may be Thr or Ala

60
<220>
<221> VARIANT
<222> (97)..(97)
<223> Xaa may be Ala, Gly, or Ser

65
<220>
<221> FR4
<222> (98)..(107)

```

<176>

<400> 5
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 5 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val
 20 25 30
 10 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 15 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 20 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 25 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa
 85 90 95
 30 Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 35 <400> 6
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10
 40 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 45 <213> Human
 <400> 7
 Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln
 1 5 10 15
 55 Lys Phe Gln Gly
 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 60 <213> Human
 <400> 8

<177>

Trp Met Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Gly His Thr His Tyr Ala Gln
 1 5 10 15
 5 Lys Phe Gln Gly
 20
 10 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 9
 15 Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
 1 5 10
 20 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human
 25 <400> 10
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
 30 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Human
 35 <400> 11
 Trp Val Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15
 40 Ser Val Lys Gly
 20
 45 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human
 50 <400> 12
 Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10
 55 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human
 60 <400> 13

<178>

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human

10 <400> 14
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> human

20 <400> 15
 His Gln Tyr Ile Glu Leu Trp Ser Phe
 1 5

25 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> human

30 <400> 16
 His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe
 1 5

35 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human

40 <400> 17
 His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn
 1 5

45 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human

50 <400> 18
 Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr
 1 5 10

55 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human

60

<179>

```

<400> 19
5  Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser
   1           5           10

<210> 20
10 <211> 10
    <212> PRT
    <213> Human

<400> 20
15  Gln Thr Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala
   1           5           10

<210> 21
20 <211> 10
    <212> PRT
    <213> Human

<400> 21
25  Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Gly
   1           5           10

30 <210> 22
    <211> 20
    <212> PRT
    <213> Human

35 <220>
    <221> VARIANT
    <222> (4)..(4)
    <223> Xaa may be Gly or Ala

40 <220>
    <221> VARIANT
    <222> (6)..(6)
    <223> Xaa may be Ile or Asn

45 <220>
    <221> VARIANT
    <222> (8)..(8)
    <223> Xaa may be Ile or Leu

50 <220>
    <221> VARIANT
    <222> (9)..(9)
    <223> Xaa may be Phe or Ala

55 <220>
    <221> VARIANT
    <222> (11)..(11)
    <223> Xaa may be Thr or His

60 <220>
    <221> VARIANT
    <222> (12)..(12)

```

<180>

<223> Xaa may be Ala or Thr
 <220>
 <221> VARIANT
 5 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa may be Asn or His
 <400> 22
 10 Trp Met Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln
 1 5 10 15
 15 Lys Phe Gln Gly
 20
 <210> 23
 <211> 22
 20 <212> PRT
 <213> Human
 <220>
 <221> VARIANT
 25 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa may be Ser or Thr
 <220>
 <221> VARIANT
 30 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa may be Gly or Asn
 <220>
 <221> VARIANT
 35 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa may be Ala or Thr
 <220>
 <221> VARIANT
 40 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa may be Gly, Ser, or Thr
 <220>
 <221> VARIANT
 45 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa may be Ser or Gly
 <400> 23
 50 Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Trp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa Tyr
 1 5 10 15
 55 Ala Ala Xaa Val Lys Gly
 20
 <210> 24
 60 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Human

<181>

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Xaa may be His or Gln

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 10 <223> Xaa may be Asp, Glu, Gln, Ser, Thr, or Phe

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 15 <223> Xaa may be Gln, Leu, Ile, His, Tyr, or Phe

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(7)
 20 <223> Xaa may be Trp, His, Ser, or Pro

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 25 <223> Xaa may be Ala, Gln, Val, Asn, Pro-Phe, Pro-Met, or Ser-Phe

 <400> 24
 30 Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 25
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Human

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 40 <223> Xaa may be Ser or Thr

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(4)
 45 <223> Xaa may be Asp or Thr

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 50 <223> Xaa may be Ala or Arg

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 55 <223> Xaa may be Gln or Phe

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 60 <223> Xaa may be Ala or Thr

<182>

```

5 <220>
  <221> VARIANT
  <222> (10)..(10)
  <223> Xaa may be Ala, Gly, or Ser
  <400> 25
  Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa
10 1 5 10
  <210> 26
  <211> 10
  <212> PRT
  <213> Human
  <220>
  <221> VARIANT
  <222> (2)..(2)
  <223> Xaa may be Gly or Phe
  <220>
  <221> VARIANT
  <222> (5)..(5)
  <223> Xaa may be Ser or Arg
  <220>
  <221> VARIANT
  <222> (9)..(9)
  <223> Xaa may be Ile or Met
  <400> 26
  Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr Gly Xaa Ser
35 1 5 10
  <210> 27
  <211> 119
  <212> PRT
  <213> Human
  <220>
  <221> FRAMEWORK1
  <222> (1)..(25)
  <223> CDR3
  <220>
  <221> CDR1
  <222> (26)..(35)
  <223> CDR1
  <220>
  <221> FRAMEWORK2
  <222> (36)..(46)
  <223> CDR3
  <220>
  <221> CDR2
  <222> (47)..(66)
  <223> CDR2

```

<183>

```

<220>
<221> FRAMEWORK3
<222> (67)..(98)
5 <223> CDR3

<220>
<221> CDR3
<222> (99)..(108)
10 <223> CDR3

<220>
<221> FRAMEWORK4
<222> (109)..(119)
15 <223> CDR3

<400> 27
20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
    1          5          10          15

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

    Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
30          35          40          45

    Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
35          50          55          60

    Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
40          65          70          75          80

    Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
45          85          90          95

    Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
50          100          105          110

    Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
55          115

<210> 28
<211> 109
<212> PRT
<213> Human
55

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
60 <223> Xaa may be Asp or Glu

<220>
<221> FRAMEWORK1

```

<184>

```

<222> (1)..(23)
<223> VH1A

5 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (24)..(35)
  <223> CDR1

10 <220>
  <221> FRAMEWORK2
  <222> (36)..(46)
  <223> VH1A

15 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (47)..(57)
  <223> CDR2

20 <220>
  <221> FRAMEWORK3
  <222> (58)..(89)
  <223> VH1A

25 <220>
  <221> MISC_FEATURE
  <222> (90)..(97)
  <223> CDR3

30 <220>
  <221> FRAMEWORK4
  <222> (98)..(109)
  <223> VH1A

35 <400> 28
  Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1 5 10 15

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

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

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

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

60 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His
  85 90 95

60 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
  100 105
  
```

<185>

도면의 간단한 설명

- <17> 도 1은 각 컬럼이 비-섬유증 폐 조직으로부터 분리된 섬유모세포와 비교하여 UIP 섬유모세포에서 섬유증과 관련된 유전자 발현의 배수 증가를 나타내는 컬럼 그래프를 나타낸 것이다 (1의 값에 대하여 정규화): aSMA: PCOL1; PCOL3; CTGF; TGFβ-1; TGFβR1; TGFβR2; IL13Ra1; IL13Ra2.
- <18> 도 2는 비-섬유증 및 섬유증 폐 조직으로부터 유래된 섬유모세포에 의한 aSMA 발현에서 TGFβ1, PDGF 및 CCL2의 효과를 나타내는 컬럼 그래프이다.
- <19> 도 3은 비-섬유증 및 섬유증 폐 조직으로부터 유래된 섬유모세포에 의한 프로콜라겐 I (A) 및 프로콜라겐 III (B) 유전자 발현에서 TGFβ1, PDGF 및 CCL2의 효과를 나타내는 두 개의 컬럼 그래프이다.
- <20> 도 4는 비-섬유증 및 섬유증 폐 조직으로부터 유래된 섬유모세포에 의한 TGFβ1 유전자 발현에서 TGFβ1, PDGF 및 CCL2의 효과를 나타내는 컬럼 그래프이다.
- <21> 도 5는 비-섬유증 및 섬유증 폐 조직으로부터 유래된 섬유모세포에 의한 CTGF 유전자 발현에서 TGFβ1, PDGF 및 CCL2의 효과를 나타내는 컬럼 그래프이다.
- <22> 도 6은 비-섬유증 및 섬유증 폐 조직으로부터 유래된 섬유모세포에 의한 TGFβRI (A) 및 TGFβRII (B) 유전자 발현에서 TGFβ1, PDGF 및 CCL2의 효과를 나타내는 두 개의 컬럼 그래프이다.

<23> 도 7은 비-섬유증 및 섬유증 폐 조직으로부터 유래된 섬유모세포에 의한 IL 13Ra1 (A) 및 IL13Ra2 (B) 유전자 발현에서 TGFβ1, PDGF 및 CCL2의 효과를 나타내는 두 개의 컬럼 그래프이다.

<24> 서열 목록의 간단한 설명

서열 번호	설명
1	항-MCP-1 결합체를 선택하는데 사용되는 인간 MCP-1 (CCL2) 및 변이체
2	VH1A 중쇄 가변 서열 : FR1, CDR1, FR2, CDR2 변이체, FR3, CDR3, FR4
3	VH3 중쇄 가변 서열 : FR1, CDR1, FR2, CDR2 변이체, FR3, CDR3, FR4
4	카파3 경쇄 가변 서열 : FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 변이체, FR4
5	람다3 경쇄 가변 서열 : FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 변이체, FR4
6	VH1A CDR1 All MOR03471
7	VH1A CDR2 3781, 3790, CNTO 888
8	VH1A CDR2 3899
9	VH1A CDR3 All MOR03471
10	VH3 CDR1 All MOR03548
11	VH3 CDR2 3744, 3747
12	VH3 CDR3 All MOR03548
13	카파 3 CDR1 All MOR03471
14	카파 3 CDR2 All MOR03471
15	카파 3 CDR3 3781
16	카파 3 CDR3 3790, CNTO888
17	카파 3 CDR3 3899
18	람다 3 CDR1 All MOR03548
19	람다 3 CDR2 All MOR03548
20	람다 3 CDR3 3744
21	람다 3 CDR3 3747
22	VH1A CDR2 변이체
23	VH3 CDR2 변이체

<25>

24	Lk CDR3 변이체
25	Lλ CDR3 변이체
26	HC CDR1 변이체
27	CNTO888 중쇄 가변 영역
28	CNTO888 경쇄 가변 영역

<26>

<27> 발명의 상세한 설명

<28> 약어

<29> Abs: 폴리클로날 또는 모노클로날 항체; Ig: 면역글로불린; Mab: 모노클로날 항체; V: 항체의 가변 도메인; C: 항체의 불변 도메인; H: 항체의 중쇄; L: 항체의 경쇄; HRCT: 고해상전산화단층촬영술; PDGF - AB: 혈소판-유래의

성장 인자 알파/베타; CTGF: 연결 조직 성장 인자; CXC: CXC 하위 분류의 케모카인; aSMA: 알파-平滑근 액틴; PCOL1: 프로콜라겐 I; PCOL3: 프로콜라겐 III; TGFβ1: 형질전환 성장 인자 베타-1; TGFβR1: TGFβ 수용체 I형; TGFβR2: TGFβ 수용체 II형; IL13Ra1: 인터루킨-13 수용체 알파 1 서브유닛; IL13Ra2: 인터루킨-13 수용체 알파 2 서브유닛.

<30> 정의

<31> 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용된다. 본원에 사용되는 "항체"는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편 또는 이의 단일 사슬을 포함한다. 따라서, 항체는 면역글로불린 분자의 적어도 한 부분, 이를 테면 비제한적으로, 중쇄 또는 경쇄의 적어도 하나의 상보성-결정 영역 (CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 (FR) 영역, 또는 이의 임의의 부분, 또는 본 발명의 항체로 도입될 수 있는 결합 단백질의 적어도 한 부분을 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 용어 "항체"는 항체, 이의 절단 단편, 특정 부분 및 단일 사슬 항체 및 이의 단편을 포함하는 항체, 또는 이의 특정 단편 또는 이의 부분의 구조 및/또는 작용을 모방하는 항체의 부분을 포함하거나 항체 모방체를 포함하는 변이체를 포함하는 것으로 추가로 의도된다. 작용 단편은 미리 선택된 표적에 대한 항원-결합 단편을 포함한다. 용어 항체의 "항원 결합 부분"에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH 도메인으로 구성된 1개의 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 이황화 가교로 연결된 두개의 Fab 단편을 포함하는 2개의 단편; (iii) VH 및 CH 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 두개의 도메인 VL 및 VH가 분리된 유전자에 의해 암호화되지만, 그들은 재조합 방법을 사용하여 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1개의 분자 (단일 사슬 Fv (scFv) 로도 알려짐)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어지게 하는 합성 링커에 의하여 결합될 수 있다; 예를 들어, Bird et al.1988 Science 242:423-426, and Huston et al. 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879- 5883 참고. 이러한 단일 사슬 항체는 또한 용어 항체의 "항원-결합 부분"에 포함되는 것으로 의도된다. 본 분야의 숙련자에 알려진 통상의 기술을 사용하여 항체 단편이 수득되며, 상기 단편은 손상되지 않은 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 스크리닝된다.

<32> "CCR2"는 인간 CCR2A (MCP-1RA, NP_000638) 및/또는 인간 CCR2B (MCP-1RB, NP_000639) 및 자연 발생 또는 내인성 상응하는 포유동물 CCR2 단백질 (예를 들어, 재조합 단백질)의 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미한다. 아형 A인 CCR2A는 다운스트림 정지 코돈의 사용 및 프레임쉬프트(frameshift)를 유발하는 코딩 영역에서의 선택적 스플라이싱 때문에, 독특한 C-말단을 가지며, 아형 B인 CCR2B보다 14개 아미노산이 더 길다 (Charo, et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (7): 2752-2756). 본원에서 정의된 CCR2는 포유동물 CCR2 (예를 들어, 선택적 스플라이싱 또는 다른 세포 과정에 의해 생성된)의 성숙된 수용체 단백질, 다형성 또는 대립형질 변이체 및 아형 및 상기한 것의 변형되거나 변형되지 않은 형태를 포함한다 (예를 들어, 글리코실화, 비글리코실화). 이러한 단백질은 예를 들어 자연적으로 포유 동물 CCR2를 생성하는 소스로부터 회수되거나 분리될 수 있다.

<33> "CCR2 길항제"는 CCR2A 또는 CCR2B 또는 본원에 정의된 다른 아형 또는 변이체를 나타내는 세포에서 CCR2A 또는 CCR2B와 관련된 생물학적 기능 또는 생물활성을 방지한다. 본 발명의 범위 내에 포함되는 길항제는 MCP-1/CCL2 또는 CCR2에 결합하거나 CCR2와 그의 동족체 리간드(들)의 결합을 방지하여 CCR2 생물학적 기능을 억제시키는 항체, 합성 또는 천연 서열 펩티드 및 소분자 길항제를 포함한다. 따라서, 억제제는 수용체에 결합하는 길항제를 포함하는 물질 (예를 들어, 항체, 천연 리간드의 돌연변이, 소분자량 유기 분자, 리간드 결합의 다른 경쟁적 억제제) 및 거기에 결합하지 않고 수용체 작용을 억제하는 물질 (예를 들어, 항-이디오타입 항체)를 언급한다.

<34> "통상형 간질폐렴" 또는 "UIP"는 또한, 임상적으로 및 조직학적으로 "특발성 폐 섬유증" 또는 "IPF" 및 "잠재성 섬유화 폐포염"으로도 알려져 있다. 이는 특발성 간질폐렴 (IIP)의 가장 통상적인 6개의 조직학적 아형이다. 다른 IIP는 비특이적 간질폐렴 (NSIP), 폐쇄성 세기관지 기질화 폐렴 (BOOP); 호흡 세기관지염-관련 간질폐 질환 (ILD); 박리성 간질폐렴; 및 급성 간질폐렴 (AIP)이다.

<35> "MCP-1"은 NCBI 기록 수탁 번호 NP_002973를 참고로 한 76개 아미노산 서열을 의미하며, MCP (단핵구 화학주성 단백질), SMC-CF (平滑근 세포 화학주성 인자), LDCF (림프구-유래 화학주성 인자), GDCF (신경아교종-유래 단핵구 화학주성 인자), TDCF (종양-유래 화학주성 인자), HC11 (인간 사이토카인 11), MCAF (단핵구 화학주성 및 활성화 인자)로 다양하게 알려져 있다. 유전자 기호는 SCYA2이며, 인간 크로모솜 17 상의 JE 유전자이고 새로운 명명은 CCL2이다 (Zlotnik, Yoshie 2000. Immunity 12: 121-127). JE는 인간 MCP-1/CCL2의 마우스 호모로

그이다.

<36> MCP-1 길항제 소분자는 MCP-1 활성을 억제하고, 유력한 치료제로 사용될 수 있는 임의의 적합한 화학적 화합물을 말한다. 이러한 화합물은 본원에 참고로 전체가 각각 인용된 PCT 공보 제 WO 9905279호 (1999), 제 WO 9916876호 (1999), 제 WO 9912968호, 제 WO 9934818호, 제 WO 9909178호, 제 WO 9907351호, 제 WO 9907678호, 제 WO 9940913호, 제 WO 9940914호, 제 WO 0046195호, 제 WO 0046196호, 제 WO 0046197호, 제 WO 0046198호, 제 WO 0046199호, 제 WO 9925686호, 제 WO 0069815호, 제 WO 0069432호, 제 WO 9932468호, 제 WO 9806703호, 제 WO 9904770호, 제 WO 99045791호에 개시된 바와 같이, CCR1 또는 CCL2 그 자신의 억제 및/또는 CCR2B에 대한 CCL2의 결합을 차단하는 능력을 지닌 인돌 유도체, 사이클릭 아민 유도체, 우레이도 유도체, 헤테로사이클릭, 아닐라이드 및 기능성 피롤과 같이 본 분야에 알려져 있다.

<37> 본원에 사용된 본 발명에서 사용되는 "치료"는 만성 거부의 기능적 또는 조직학적 징후를 "조절"하고 "역행"시키는 것을 포함하는 둘 모두의 치료를 의미한다.

<38> 본 발명으로 치료될 수 있는 포유 동물은 가축(livestock) 포유 동물, 이를 테면 암소, 말, 등, 집 동물(domestic animal), 이를 테면 개, 고양이, 랫트 등 및 인간, 바람직하게는 인간을 포함한다.

<39> **인용**

<40> 본원에 개시된 모든 공보 또는 특허는 그들이 본 발명의 시기에 기술 상태를 나타내고 본 발명의 사용가능성 및 설명을 제공하기 때문에, 전체가 본원에 참고로 인용된다. 공보는 임의의 과학적 또는 특허 공보, 또는 모든 기록, 전자 또는 인쇄된 형식을 포함하는 임의의 미디어 형식에서 이용할 수 있는 임의의 다른 정보를 말한다. 다음 참고 문헌은 본원에 참고로 전체가 인용된다: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2006; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2006; Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2006).

<41> **본 발명의 통상형 간질페렘 (UIP) 및 특발성 폐 섬유증 화합물**

<42> MCP-1은 케모카인 수용체 CCR2에 결합하고, 이를 통해 신호를 전달한다고 알려져 있다. CCR2는 단핵구, T-세포, B-세포 및 호염기구를 포함하는 많은 세포에서 발현하는 7개의 막-횡단-스패닝 G-단백질-커플된 수용체이다. MCP-1의 나노몰 (nM) 농도에 대하여 신호를 전달하는 2개의 MCP-1 특이적 수용체, CCR2A 및 CCR2B를 클로닝하였다. CCR2A (CC-CCR2A) 및 CCR2B (CC-CCR2A)는 선택적으로 스플라이싱된 카복실 꼬리를 갖는 두 개의 MCP-1 특이적 수용체를 암호화하는 두 개의 cDNA를 나타낸다. MCP-1은 두 개의 아형과 높은 친화도로 결합하며, MCP-1은 CCR2B를 발현하는 세포에서 칼슘 유동을 유도하나, CCR2A를 발현하는 세포에서는 그렇지 않다. CCR2A를 발현하는 세포에 비해 5배 적은 MCP-1이 CCR2B를 발현하는 세포에서 화학주성을 유도한다.

<43> 인간 MCP-1에 대하여 특정한 작용 및 서열 상동성을 갖는 다른 단백질이 알려져 있다. MCP-1 (GenBank NP_002973)과 특히 유사한 것은 MCP-2 (GenBank NP_005614) 및 에오타신 (GenBank P_51671)이며; MCP-2는 MCP-1에 대하여 61.8 퍼센트 서열 동일성 및 에오타신-1은 MCP-1에 대하여 63.2 퍼센트의 서열 동일성을 갖는다. MCP-1의 호모로그에 대하여 인간 항상성 기작 및 병리학에서 이들 단백질의 관련 스펙트럼 및 활동 범위는 잘 알려져 있지 않다. 예를 들어, MCP-2 (CCL8로 재명명)은 MCP-1 및 MCP-3 (CCL7로 재명명, Genbank NP_006264)와 밀접하게 관련이 있으며, 그의 작용 수용체로서 CCR1 및 CCR2B를 둘 다 사용한다. MCP-3는 D6로 명명된 수용체에 결합한다. MCP-3는 또한 CCR10 및 CCR1에 결합한다. MCP-3 단백질 (97개 아미노산) 서열은 MCP-1과 74 퍼센트 동일성 및 MCP-2와 58 퍼센트 상동성을 나타낸다. 분비된 MCP-3은 N-글리코실화된 MCP-1과 다르다. MCP-4 (CCL13로 재명명, Genbank NP_005399)은 3개의 공지된 단핵구 화학주성 단백질과 56-61 퍼센트 서열 동일성을 공유하며, 에오타신-1과 60 퍼센트 동일성이 있다. MCP-4의 작용은 MCP-3 및 에오타신의 것과 매우 유사한 것으로 보인다. MCP-3와 같이, MCP-4는 단핵구 및 T-림프구에 대하여 강력한 화학주성이다. 이는 호중구에서는 불활성이다. 단핵구에서, MCP-4는 MCP-1, MCP-3, RANTES (CCL5) 및 에오타신을 인지하는 수용체, CCR1 및 CCR3 수용체에 결합하고, 에오타신-1과 완전한 교차-탈감작을 나타낸다. MCP-5는 무린 CC-케모카인이며, 인간 MCP-1과 가장 근접하게 관련된다 (66 % 아미노산 동일성). MCP-5에 대한 유전자 기호는 SCYA12 (CCL 12로 재명명)이다. 케모카인 수용체 CCR2로 트랜스펙션(transfected)된 세포는 MCP-5에 반응하는 것을 보인다. 사이토카인 및 케모카인에서 일반적인 정보는 월드-와이드 인터넷에서 이용가능하고, 현재 분류 시스템에 대하여

는 문헌 [Zlotnik A., Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127]에서 이용가능하다.

- <44> 상기한 고찰은 길항제가 CCR2 또는 그의 리간드 CCL2, CCL7, CCL8 중 하나에서 직접적 활성화에 의한 CCR2 결합의 생물학적 작용을 방지할 수 있는 것을 강조하기 위하여 기술하였다. 본 발명의 일 구체예에서, 길항제는 MCP-1/CCL2에 결합하고, CCR2에 결합하는 그의 능력을 중화시킨다.
- <45> 항-CCR2 항체는 제 US6084075호, 제 US6458353호 및 제 US6696550호에 개시되어 있다. 본 발명의 방법의 일 구체예에서, 포유 동물 CCR2를 지니는 세포와 케모카인의 생물학적 상호작용을 억제하는 방법은 상기 세포를 CCR2 또는 상기 수용체의 부분에 결합하는 항체 또는 이의 기능적 단편의 유효량과 접촉시키는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체 (mAb) LS132.1D9 (1D9)이거나, 인간 CCR2 또는 인간 CCR2의 부분에 결합하기 위하여 1D9과 경쟁할 수 있는 항체이다. 상기한 항체의 기능적 단편이 또한 포함된다.
- <46> MCP-1과 결합할 수 있는 항체가 기록되었다: 제 JP9067399호는 분리된 혈구 세포로부터 수득된 항체를 개시하며, 제 JP05276986호는 IgM 항-인간 MCP-1을 분비하는 하이브리도마를 개시한다. 더욱 최근에 MCP-1을 포함한 다수의 베타-케모카인과 결합할 수 있는 항체 (제 W003048083호) 및 에오타신과 결합하는 MCP-1 결합 항체 (제 US20040047860호)가 개시되었다. 인간 MCP-1/CCL2 또는 인간 MCP-1/CCL2의 마우스 호모로그와 선택적으로 결합하고 중화시키는 항체는 본원에 내용과 교시가 참고로 인용된 함께 계류 중인 특허 출원 미국 제 11/170,453호 및 제 60/682,654호의 출원에 개시되었다.
- <47> 본 발명의 일 구체예에서, CCR2 길항제는 함께 계류 중인 미국 특허 출원 제 11/170,453호에 개시된 C1142로 명명된 세포주에 의하여 생성될 수 있는 C775로 명명된 항-인간 MCP-1/CCL2 항체, 본원에 정의된 이의 변이체, 이를 테면 인간화 또는 재구성된 형태, 절단된 형태 또는 결합 단편이다. 또다른 구체예에서, CCR2 길항제는 그 내용과 교시가 본원에 참고로 인용되는 함께 계류 중인 특허 출원 제 W02006125202의 출원에 개시된 CNT0888로 명명된 항-인간 MCP-1/CCL2 항체, 본원에 정의된 이의 변이체, 절단 형태 또는 결합 단편이다.
- <48> 일 구체예에서, MCP-1 항체는 서열 번호 27 및 28의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 둘 다 포함한다. 항체는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 상기 항체는 서열 번호 6, 7, 9, 13, 14 및 16의 모든 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄를 포함하는 적어도 하나의 가변 영역을 포함하며, 상기 MCP-1 항체는 서열 번호 27 및 28을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다를 포함한다. 항체는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 상기 항체는 서열 번호 6, 7, 9, 13, 14 및 16 중 적어도 하나의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 아미노산 서열을 모두 포함한다. 상기 항체는 서열 번호 6, 7, 9, 13, 14 및 16 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함할 수 있다. 상기 항체는 선택적으로 서열 번호 6-26으로 구성된 군에서 선택된 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합 부분의 상보성 결정 영역 (CDR)을 추가로 포함하며; 임의로 인간 면역글로불린의 적어도 CH1, 힌지, CH2, 또는 CH3를 추가로 포함하는, 임의로 프레임워크 영역과 기능적으로 관련된 서열 번호 2-5 중 적어도 하나의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- <49> CCR2에 결합하는 능력을 가지며, 길항 활성을 갖는 MCP-1/CCL2 절단, 변이체, 돌연변이 단백질 또는 "뮤테인"도 본 발명의 방법을 실시하는 데 사용될 수 있다. 수소 결합의 패턴을 변경시켜 수용체에 결합하는 편성 (obligate) 모노머를 유발하며, 제 W005037305A1호에 교시된 바와 같이 시험관 내에서 작용제 특성을 가지나, 생체 내에서 항-염증 활성을 가지며, 천연 케모카인을 길항시킬 수 있는 이합체화 인터페이스에서 단일 아미노산 치환을 갖는 호모다이머-형성 케모카인, 이를 테면 CCL2의 변이체는 본 발명을 실시하는 데 유용한 변이체 중 하나이다. MCP 1의 랩티드 길항제는 절단된 MCP-1(9-76)이며, 이는 관절염의 마우스 모델에서 질환 발병을 예방하고 질환 징후를 감소시키는 것으로 보인다 (Jiang- Hong Gong, et al, *J. Exp. Med.* 1997, 186: 131).
- <50> CCR2/CCL2 발현 조절
- <51> CCR2와 그의 리간드의 상호작용을 길항시키는 대안적인 방법은 예를 들어, RNA 스플라이싱의 방법을 사용하여, CCR2 또는 그의 리간드, 특히 MCP-1/CCL2를 녹다운시키는 것이다. 따라서, 또다른 구체예에서, 본 발명의 방법을 실시하는 데 유용한 화합물은 MCP-1 서열을 표적으로 하고 MCP-1 유전자 발현을 간섭하거나, CCR2를 표적으로 하고, CCR2 유전자 발현을 간섭하는 센스 또는 안티센스 배향의 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 및 단일 또는 이중 가닥의 핵산 분자 (예를 들어, siRNA)이다.
- <52> siRNA, shRNA, 안티센스 분자 및 DNAzyme의 사용에 의한 것을 포함한 몇가지 다른 방법으로 유전자 발현이 조절

될 수 있다. siRNA 및 shRNA 둘 모두는 RNAi 경로를 통해 수행되고, 유전자의 발현을 억제하는 데 성공적으로 사용되었다. RNAi는 벌레에서 최초로 발견되었으며, dsRNA와 관련된 유전자 침묵의 현상은 Fire 및 Mello에 의하여 식물에서 최초로 기록되었으며 (Fire et al., 1998. Nature 391: 806), 식물 세포에서 RNA 바이러스의 감염을 박멸하는 방법으로 생각되었다. 이러한 경로에서, 긴 dsRNA 바이러스 산물은 DICER-유사 효소에 의하여 21-25 bp 길이의 더 작은 단편으로 처리된 다음, 이중-가닥 분자가 폴리(ADP-리보솜) 유도체 복합체 (RISC)에 로딩된다. 유전자 특이적이 아니며 세포에서 단백질 발현을 전체적으로 멈추게 하는 소위 인터페론 반응의 유도를 피하기 위하여 dsRNA 분자가 30 bp보다 더 작아야 한다는 주목할 만한 차이점을 갖는 유사한 경로가 포유 동물 세포에서 확인되었다.

<53> 합성 siRNA는 하나의 유전자를 특이적으로 표적화하도록 설계될 수 있으며, 이들은 시험관 내 또는 생체 내에서 세포로 쉽게 전달될 수 있다. shRNA는 siRNA 분자의 DNA 등가물이며, 세포의 게놈으로 도입된 다음, 모든 유사 분열 사이클 중에 복제되는 장점을 갖는다.

<54> 또한, DNAzyme은 유전자 발현을 조절하는 데 사용된다. DNAzyme은 단일-가닥 RNA를 절단하는 촉매적 DNA 분자이다. 이들은 표적 RNA 서열에 대하여 매우 선택적이며, 이와 같은 것은 메신저 RNA의 표적화를 통하여 특정 유전자를 하향-조절하는 데 사용될 수 있다.

<55> RNA 간섭은 동물에서 짧은 간섭 RNA (siRNAs)에 의해 매개되는 서열-특이적 전사-후 유전자 침묵 과정을 말한다 (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Fire et al., 1998, Nature, 391, 806; Hamilton et al., 1999, Science, 286, 950-951; Lin et al., 1999, Nature, 402, 128-129; Sharp, 1999, Genes & Dev., 13: 139-141; and Strauss, 1999, Science, 286, 886). 세포에 dsRNA의 존재는 아직 완전하게 특성화되지 않은 기작을 통하여 RNAi 반응을 기폭시킨다. 이러한 기작은 리보뉴클레아제 L에 의한 mRNA의 비-특이적 절단을 유발하는 2',5'-올리고아데닐레이트 합성효소 및 단백질 키나아제 PKR의 dsRNA-매개의 활성화로부터 유발되는 이중 가닥 RNA-특이적 리보뉴클레아제, 이를 테면 인터페론 반응을 포함하는 다른 공지된 기작과 다른 것으로 보인다 (예를 들어 미국 특허 제 6,107,094호; 제 5,898,031호; Clemens et al., 1997, J. Interferon & Cytokine Res., 17, 503-524; Adah et al., 2001, Curr. Med. Chem., 8, 1189 참고).

<56> 세포에서 긴 dsRNA의 존재는 다이스 (dicer)로 언급되는 리보뉴클레아제 III 효소의 활성을 자극시킨다 (Bass, 2000, Cell, 101, 235; Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293). 다이스는 dsRNA를 짧은 간섭 RNA (siRNA)로 알려진 dsRNA의 짧은 조각으로 처리하는 데 관여한다 (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Bass, 2000, Cell, 101, 235; Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363). 다이스 활성으로부터 유래된 짧은 간섭 RNA는 전형적으로 약 21 내지 약 23 뉴클레오티드 길이며, 약 19 염기 쌍 듀플렉스를 포함한다 (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188). 또한, 다이스는 번역 조절과 관련된 보존된 구조의 전구체 RNA로부터 21- 및 22- 뉴클레오티드의 작은 일시적 RNA (stRNA)의 절단에 관련된다 (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834). RNAi 반응은 또한 통상적으로 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 서열을 갖는 단일-사슬 RNA의 절단을 매개하는 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)로 알려진 엔도뉴클레아제 복합체를 특징으로 한다. 표적 RNA의 절단은 siRNA 듀플렉스의 안티센스 가닥에 상보적인 영역의 중앙에서 발생한다 (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188).

<57> siRNA는 표적 서열 및 그의 상보물을 포함하는 이중 가닥 RNA이다. 두 개의 우리딘 잔기가 RNA의 3' 말단에 첨가된다 (Elbashir et al. 2001 Nature 411:494-498).

<58> RNA 간섭 (RNAi)은 현재 포유 동물 세포에서 특정 유전자의 발현을 감소시킨 기능적 결과를 연구하기 위하여 통상적으로 사용된다. RNAi는 2개 뉴클레오티드의 3' 오버행을 지닌 -21 뉴클레오티드 길이의 이중-가닥 RNA 분자 (Elbashir et al. 2001 supra) 또는 관심 유전자에 상보적인 헤어핀-형성 45-50mer (shRNA) 분자 (Paddison, PJ, et al., 2002. Genes & Development 16:948-958)를 포함하는 소간섭 RNA를 트랜스펙션시켜 유도된다. 포유 동물 세포에 트랜스펙션될 때, siRNA 발현 플라스미드는 외인성 및 내인성 유전자 산물의 수준을 감소시키는 것으로 보인다. 그들이 화학적으로 합성되거나 시험관 내에서 전사된 siRNA보다 더 제조하는 데 노력을 요구할지라도, siRNA 벡터는 선택가능한 마커와 함께 공동 발현되는 경우 표적 유전자 발현의 장기 감소를 제공할 수 있다 (Brummelkamp, TR, et al., 2002. Science 296:550-553).

<59> 비-단백질, 비-올리고핵산 길항제

<60> 소분자 약물 및 펩티도미메틱은 또한 CCR2의 길항제일 수 있다. 예를 들어, 제 W004069809호, 제 W004069810호, 제 W005118574호, 제 W006015986호는 CCR2 수용체 길항제로서 머캅토아미다졸을 교시하였다.

바람직한 생물학적 특성을 갖는 다른 소분자는 본원에 기술된 것과 같은 방법을 사용하여 스크리닝함으로써 선택될 수 있고, 만성 거부의 방지 및 지속적인 이식편 생존의 특성을 가질 수 있다.

<61> **항체 제조 방법**

<62> 본 발명의 CCR2 길항제 항체는 Kohler 및 Milstein (1975) Nature 256:495의 표준 체세포 혼성화 기술 (하이브리도마 방법)을 포함하는 다양한 기술에 의해 임의로 생성될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 또는 다른 적절한 숙주 동물, 이를 테면 햄스터 또는 마카크(macaque) 원숭이는 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 것인 항체를 생성하거나 이를 생성할 수 있는 림프구를 유도해내기 위하여, 본원에 기술된 바와 같이 면역화된다. 선택적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 그 다음, 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용합제를 사용하여 골수종 세포와 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59- 103 (Academic Press, 1986)).

<63> CCR2 길항 항체는 또한 본원에 기술된 바와 같이 및/또는 본 분야에 알려진 바와 같이 인간 항체의 레파토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 비-인간 영장류 등)의 면역화에 의하여 임의로 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 항-MCP-1 항체를 생성하는 세포는 이러한 동물로부터 분리될 수 있으며, 적합한 방법, 이를 테면 본원에 기술된 방법을 사용하여 무한증식화된다.

<64> 그들의 생식 계열 배열에 인간 면역글로불린 (Ig) 자리를 갖는 트랜스제닉 마우스의 사용이 정상 인간 면역계가 허용되는 인간 자가 항원을 포함한 다양한 표적에 대한 고 친화성 완전 인간 모노클로날 항체의 분리를 위해 제공된다 (Lonberg, N. et al, US5569825, US6300129 and 1994, Nature 368:856-9; Green, L. et al., 1994, Nature Genet. 7: 13-21; Green, L. & Jakobovits, 1998, Exp. Med. 188:483-95; Lonberg, N and Huszar, D., 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Kucherlapati, et al. US6713610; Bruggemann, M. et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21 : 1323- 1326; Fishwild, D. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez, M. et al., 1997, Nat. Genet. 15: 146-156; Green, L., 1999, J. Immunol. Methods 231 :11-23; Yang, X. et al., 1999, Cancer Res. 59: 1236-1243; Bruggemann, M. and Taussig, M J., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455- 458, 1997; Tomizuka et al. WO02043478). 이러한 마우스에서 내인성 면역글로불린 자리는 파괴되거나 결실되어, 내인성 유전자에 의해 암호화된 항체를 생성하는 동물의 능력을 제거할 수 있다. 또한, Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 및 Medarex (San Jose, Calif.)와 같은 회사가 상기 기술된 바와 같은 기술을 사용하여 선택된 항원에 대한 인간 항체를 제공하도록 할 수 있다.

<65> 면역원성 항원의 제조 및 모노클로날 항체 생성은 재조합 단백질 생성과 같은 임의의 적합한 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 면역원성 항원은 정제된 단백질, 또는 전체 세포 또는 세포 또는 조직 추출물을 포함하는 단백질 혼합물의 형태로 동물에 투여될 수 있거나, 항원은 상기 항원 또는 이의 부분을 암호화하는 핵산으로부터 동물의 체내에서 새로이 형성될 수 있다. 항원으로서의 면역화는 임의로 완전 프로인트 어쥬반트 (complete Freund's adjuvant)와 같은 어쥬반트의 첨가에 의해 일어날 수 있다. 면역 반응은 안와후방 채혈에 의하여 수득된 혈장 샘플을 사용한 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐 모니터링될 수 있다. 혈장은 ELISA에 의해 스크리닝될 수 있으며(상기 기술된 바와 같이), 충분한 역가의 항-MCP-1 면역글로불린을 지닌 마우스는 융합을 위해 사용될 수 있다. 마우스는 희생 및 비장 제거 3일 전에, 정맥 내로 항원을 사용하여 부스팅 (boosted) 될 수 있다. 각 항원에 대하여 2-3번의 융합이 수행되는 것이 필요할 수 있는 것으로 기대된다. 몇몇 마우스는 각 항원에 대하여 면역화될 것이다.

<66> 모노클로날 CCR2 길항제 항체를 생성하는 하이브리도마를 생성하기 위하여, 면역화된 마우스로부터의 비세포 및 림프절 세포가 분리되고, 적절한 무한증식화 세포주, 이를 테면 마우스 골수종 세포주에 융합될 수 있다. 생성된 하이브리도마는 항원-특이적 항체의 생성에 대하여 스크리닝될 수 있다.

<67> 면역글로불린 사슬을 생성할 수 없는 적합한 무한증식 세포주가 융합 파트너, 예를 들어, 골수종 세포주, 이를 테면 비제한적으로 Sp2/0 및 유도 세포주, NS1 및 유도체, 특히 NSO 유전자 조작된 NSO 세포주, 이를 테면 GS-NSO, AE-1, L.5, P3X63Ag8.653, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-I, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/0 등, 또는 이형 골수종(heteromyelomas), 이의 융합 산물, 또는 이로부터 유래된 임의의 세포 또는 융합 세포, 또는 본 분야에 알려진 임의의 다른 적합한 세포주로서 선택된다 (Birch et al. 1994. Biologies 22: 127-133). 융합된 세포 (하이브리도마) 또는 재조합 세포는 선택적 배양 조건 또는 다른 적합한 공지의 방법을 사용하여 분리될 수 있으며, 한계 희석, 세포 분류, 또는 다른 공지의 방법에 의하여 클로닝될 수 있다. 원하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 세포는 적합한 분석법(예를 들어, ELISA)으로 검출될 수 있으며, 조작을 위해 선택된다.

<68> 펩티드 또는 단백질 라이브러리로부터 재조합 항체를 선택하는 방법 (예를 들어, 비제한적으로, 박테리오파지, 리보솜, 올리고뉴클레오티드, RNA, cDNA, 등, 디스플레이 라이브러리; 예를 들어, Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; Biolnvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys에서 입수할 수 있는 것)을 포함하나 이에 한정되지 않는 필요한 특이성의 항체를 생성하거나 분리하는 다른 적합한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 제 EP 368,684호, 제 PCT/GB91/01134호; 제 PCT/GB92/01755호; 제 PCT/GB92/002240호; 제 PCT/GB92/00883호; 제 PCT/GB93/00605호; 제 US 08/350260(5/12/94)호; 제 PCT/GB94/01422호; 제 PCT/GB94/02662호; 제 PCT/GB97/01835호; (CAT/MRC); 제 W090/14443호; 제 W090/14424호; 제 W090/14430호; 제 PCT/US94/1234호; 제 W092/18619호; 제 W096/07754호; (Scripps); 제 EP 614 989호 (MorphoSys); 제 W095/16027호 (Biolnvent); 제 W088/06630호; 제 W090/3809호 (Dyax); 제 US 4,704,692호 (Enzon); 제 PCT/US91/02989호 (Affymax); 제 W089/06283호; 제 EP 371 998호; 제 EP 550 400호; (Xoma); 제 EP 229 046호; 제 PCT/US91/07149호 (Ixsys); 또는 본 분야에 알려진 바와 같이 및/또는 본원에 기술된 바와 같이, 인간 항체의 레파토리를 생성할 수 있는 확률적으로 생성된 펩티드 또는 단백질 - 제 US 5723323호, 제 5763192호, 제 5814476호, 제 5817483호, 제 5824514호, 제 5976862호, 제 WO 86/05803호, 제 EP 590689호 (Ixsys, now Applied Molecular Evolution (AME), 각각 전체가 본원에 참고로 인용) 참고. 이러한 기술은 리보솜 디스플레이 (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); 단일 세포 항체 생성 기술 (예를 들어, 선택된 림프구 항체 방법 ("SLAM") (미국 특허 제 No. 5,627,052호, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); 겔 마이크로드로플렛 (gel microdroplet) 및 유세포 분석 (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182: 155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B-세포 선택 (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19: 125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988))을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<69> 또한, 유사 단백질 또는 단편에 대한 특이적 결합을 위한 항체의 스크리닝은 펩티드 디스플레이 라이브러리를 사용하여 통상적으로 성취될 수 있다. 이러한 방법은 원하는 작용 또는 구조를 갖는 개개의 구성원에 대하여, 펩티드의 큰 집단을 스크리닝하는 것을 포함한다. 펩티드 디스플레이 라이브러리를 사용하는 항체 스크리닝은 본 분야에 잘 알려져 있다. 디스플레이된 펩티드 서열은 3 내지 5000개 이상 아미노산 길이, 종종 5-100개 아미노산 길이 및 흔히 약 8 내지 25개 아미노산 길이일 수 있다. 펩티드 디스플레이 라이브러리, 벡터 및 스크리닝 키트는 Invitrogen (Carlsbad, CA), 및 Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK)와 같은 공급자로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 예를 들어, Enzon에 양도된 미국 특허 제 4704692호, 제 4939666호, 제 4946778호, 제 5260203호, 제 5455030호, 제 5518889호, 제 5534621호, 제 5656730호, 제 5763733호, 제 5767260호, 제 5856456호; Dyax에 양도된 제 5223409호, 제 5403484호, 제 5571698호, 제 5837500호, Affymax에 양도된 제 5427908호, 제 5580717호; Cambridge antibody Technologies에 양도된 제 5885793호; Genentech에 양도된 제 5750373호, Xoma, Colligan, supra에 양도된 제 5618920호, 제 5595898호, 제 5576195호, 제 5698435호, 제 5693493호, 제 5698417호; Ausubel, supra; 또는 Sambrook, supra,을 참고하며, 상기 특허 및 공보는 각각 본원에 전체가 참고로 인용된다.

<70> 항체 단편

<71> 항체 단편은 무손상 항체의 단백질 가수 분해의 절단을 통하여 유래될 수 있다 (예를 들어, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); and Brennan et al., Science, 229:81 (1985) 참고). 그러나 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의하여 직접적으로 생성될 수 있다. F(ab')₂, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 포유 동물 숙주 세포 또는 E.coli에서 발현되고 이로부터 분리되어, 많은 양의 이들 단편의 용이한 생성을 허용할 수 있다. 항체 단편은 상기 기술된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 선택적으로, Fab'-SH 단편은 E. coli로부터 직접적으로 회수되고, 화학적으로 커플링되어, F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (Carter et al, Bio/Technology 10: 163- 167 (1992)).

<72> 다른 구체예에서, 항체는 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)이다. 제 WO 93/16185호; 미국 특허 제 5,571,894호; 및 미국 특허 제 5,587, 458호 참고. Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 VH 및 VL 도메인인 무손상 결합 부위를 지닌 종이다. 전형적으로, VH 및 VL 도메인은 단일 폴리펩티드에 위치하도록 클로닝되며, 재-설계되고, 단일 폴리펩티드 내에 두 개의 도메인의 상호작용을 허용하기에 충분히 긴 유연한 링커에 의해 연결된다. 선택적으로, 용

합 단백질은 sFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 융합을 수득하기 위하여, 구성될 수 있다. Antibody Engineering, 1995. ed. Borrebaeck 참고.

<73> **길항제 확인 방법**

<74> CCR2 생물학적 활성의 길항제는 하기에 예시된 적합한 시험관 내 분석법 및 생체 내 모델을 사용하여 확인될 수 있다.

<75> 결합 억제 분석법을 사용하여 CCR2에 결합하며, CCR2 또는 기능적 변이체에 대한 리간드와 같은 또다른 화합물 (예를 들어, MCP-1, MCP-2, MCP-3 및/또는 MCP-4)이 결합하는 것을 억제하는 항체 또는 이의 단편을 확인할 수 있다. 예를 들어, 항체의 부재 하에서 리간드의 결합과 비교하여 CCR2의 리간드의 결합 감소 (항체의 존재 하에서)가 검출되거나 측정될 수 있는 결합 분석법이 수행될 수 있다. 분리된 및/또는 재조합 포유 동물 CCR2 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 조성물을 리간드 및 항체와 동시에 또는 순차적 순서 중 한 순서로 접촉시킬 수 있다. 항체의 존재 하에서 리간드의 결합 정도의 감소는 항체에 의한 결합의 억제를 나타내는 것이다. 예를 들어, 리간드의 결합은 감소되거나 폐지될 수 있다.

<76> 일 구체예에서, 항체 또는 단편에 의한 포유 동물 CCR2 또는 이의 변이체에 대한 리간드(예를 들어, MCP-1/CCL2와 같은 케모카인) 결합의 직접적인 억제가 모니터링된다. 예를 들어, 항체의 포유 동물 CCR2에 대한 ¹²⁵I-표지된 MCP-1, ¹²⁵I-표지된 MCP-2, ¹²⁵I-표지된 MCP-3 또는 ¹²⁵I-표지된 MCP-4의 결합을 억제하는 능력이 모니터링될 수 있다. 이러한 분석법은 CCR2 또는 이의 기능적 변이체를 갖는 적합한 세포, 이를 테면 분리된 혈구 세포 (예를 들어, T 세포, PBMC), 또는 CCR2를 자연적으로 발현하는 적합한 세포주, 또는 포유 동물 CCR2를 암호화하는 핵산을 함유하는 세포주, 또는 상기 세포로부터의 막 분획을 사용하여 수행될 수 있다.

<77> 다른 적합한 결합 분석법, 또는 신호 작용 및/또는 세포 반응의 자극(예를 들어, 백혈구의 트래피킹 (trafficking))을 포함하여, 수용체 결합에 의해 기폭되는 사건을 모니터링하는 방법과 같은 CCR2에 결합하는 항체의 존재를 확인하는 다른 방법이 이용가능하다.

<78> 본 발명의 항체의 억제 효과가 결합 억제 분석법에서 평가될 수 있는 것이 이해될 것이다. 수용체 결합을 위한 항체들 사이의 경쟁이 또한 본 방법에서 평가될 수 있다. 이러한 방식으로 확인된 항체는 그들이 결합 이후에 CCR2의 다른 작용을 억제하기 위하여 활동하는지를 결정하기 위하여 및/또는 치료적 유용성을 평가하기 위하여 추가로 평가될 수 있다.

<79> **신호 분석법**

<80> CCR2에 대한 리간드 또는 프로모터, 이를 테면 작용제의 결합은 이러한 G 단백질-커플링된 수용체에 의한 신호를 유발할 수 있고, G 단백질 및 다른 세포내 신호 분자의 활성이 자극된다. 화합물 (예를 들어, 항체 또는 이의 단편)에 의한 신호 기능의 유도가 임의의 적합한 방법을 사용하여 모니터링될 수 있다. 이러한 분석법은 CCR2의 항체 작용제를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 항체 또는 이의 기능적 단편 또는 다른 CCR2 길항제 화합물 후보의 억제 활성은 분석법에서 리간드 또는 프로모터를 사용하여, 그리고 리간드 또는 프로모터에 의해 유도된 활성을 억제하는 항체의 능력을 평가하여 결정될 수 있다.

<81> 수용체 결합에 의해 기폭되는 G 단백질 활성, 이를 테면 GTP가 GDP로 가수분해, 또는 이후의 신호 사건, 이를 테면 세포내 (세포액) 유리 칼슘 [Ca²⁺]I 농도의 빠른 및 일시적인 증가의 유도는 본 분야에 공지된 방법 또는 다른 적합한 방법에 의하여 평가될 수 있다 (예를 들어, Neote, K. et al., Cell, 72: 415-425 1993); Van Riper et al., J. Exp. Med., 177: 851-856 (1993); Dahinden, C. A. et al., J. Exp. Med., 179: 751-756 (1994) 참고).

<82> 예를 들어, 하이브리드 G 단백질 커플링된 수용체를 사용한 Sledziewski 등의 기능적 분석법을 사용하여 수용체에 결합하고 G 단백질을 활성화시키는 리간드 또는 프로모터의 능력을 모니터링할 수 있다 (Sledziewski et al., 미국 특허 제 5,284,746호, 이의 지침이 본원에 참고로 인용됨).

<83> 이러한 분석법은 평가될 항체 또는 이의 단편의 존재 하에서 수행될 수 있으며, 상기 리간드 또는 프로모터에 의해 유도된 활성을 억제하는 항체 또는 단편의 능력은 본원에 기술된 방법 및/또는 공지의 방법을 사용하여 평가된다.

<84> **세포 자극의 화학주성 및 분석**

<85> 또한, 화학주성 분석법을 사용하여 CCR2의 길항제로서 작용하는 항체 또는 이의 기능적 단편의 능력을 평가할

수 있다. 포유 동물 CCR2 또는 그의 기능적 변이체에 대한 리간드의 결합을 차단하고, 수용체에 대한 리간드의 결합과 관련된 작용으로 화학주성을 억제하는 항체 또는 이의 단편 또는 다른 CCR2 길항제 화합물 후보의 억제 활성은 이러한 관계에서 유용하다. 이들 분석법은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 화합물, 이 경우에 CCR2를 활성화시킬 수 있는 CCL2 또는 또다른 리간드에 의해 유도된 세포의 기능적 이동을 기초로 한다. 화학주성은 예를 들어, 96-웰 화학주성 플레이트를 사용하는 분석법 또는 다른 화학주성을 평가하는 본 분야에 알려진 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 내피세포 통과(transendothelial) 화학주성 분석법의 사용이 Springer 등에 의해 기술된다 (Springer et al., WO 94/20142, published Sep. 15, 1994, 이의 교시가 본원에 참고로 인용됨; 또한 Berman et al., Immunol. Invest. 17: 625-677 (1988) 참고). 내피를 통과하여 콜라겐 겔로의 이동이 기술되었다 (Kavanaugh et al., J. Immunol., 146: 4149-4156 (1991)). 예를 들어, 화학주성일 수 있는 마우스 L1-2 예비-B 세포 또는 다른 적합한 숙주 세포의 안정한 트랜스펙턴트(transfectant)가 화학주성 분석법에 사용될 수 있다.

<86> 일반적으로, 화학주성 분석법은 배리어의 첫번째 표면으로부터 반대쪽 두번째 표면을 향해 증가된 수준의 화합물 방향으로 배리어 (예를 들어, 내피, 필터)로, 또는 이를 통하여, 적합한 세포(이를 테면 백혈구 (예를 들어, 림프구, 호산구, 호염기구)의 방향성 이동 또는 이주를 모니터한다. 필터의 첫번째 표면으로부터 필터의 반대쪽 두번째 표면을 향해 증가된 수준의 화합물 방향으로 필터로, 또는 이를 통하여, 적합한 세포의 방향성 이동 또는 이주가 모니터되도록 하는 막 또는 필터가 편리한 배리어를 제공한다. 일부 분석법에서, 막은 ICAM-1, 피브로넥틴 또는 콜라겐과 같이 점착성을 촉진하기 위한 물질로 코팅된다. 이러한 분석법은 백혈구 "귀소(homing)"의 시험관 내 근사 환경을 제공한다.

<87> 예를 들어, 적합한 컨테이너(함유 수단) 중에서 세포가 미공성 막으로 또는 이를 통하여 제1 챔버로부터 테스트 될 항체를 함유하며 막에 의해 제1 챔버로부터 분리된 제2 챔버로의 이동을 억제하는 것을 검출하거나 측정할 수 있다. 예를 들어, 니트로셀룰로오스, 폴리카보네이트를 포함하는 화합물에 대한 반응으로, 특정 이주를 모니터하는 데 적합한 포어 크기를 갖는 적합한 막이 선택된다. 예를 들어, 약 3-8 마이크론, 바람직하게 약 5-8 마이크론의 포어 크기가 사용될 수 있다. 포어 크기는 필터 상에서 균일하거나, 적합한 포어 크기의 범위 내에 있을 수 있다.

<88> 필터로의 이주, 이주 억제, 이주 거리를 평가하기 위하여, 필터의 제2 표면에 부착된 채 남아있는 필터를 횡단하는 세포의 수 및/또는 제2 챔버에 축적된 세포의 수가 표준 기술을 사용하여 결정될 수 있다 (예를 들어, 현미경 검사). 일 구체예에서, 세포는 검출가능한 표지(예를 들어, 방사성 동위원소, 형광 표지, 항원 또는 에피토프 표지)로 표지되며, 적절한 방법 (예를 들어, 방사성, 형광, 면역 분석을 검출하여)을 사용하여, 제2 챔버에 존재하고/거나 막에 부착된 표지의 존재를 결정하여 항체 또는 단편의 존재 또는 부재 하에서 이주가 평가될 수 있다. 항체 작용제에 의해 유도된 이주의 정도는 적합한 대조군과 비교하여 결정될 수 있다 (예를 들어, 항체의 부재 하에 결정된 백그라운드 이주와 비교하여, 제2 화합물 (예를 들어, 표준)에 의해 유도된 이주의 범위와 비교하여, 항체에 의해 유도된 트랜스펙션되지 않은 세포의 이주와 비교하여).

<89> 일 구체예에서, 특히 T 세포, 단핵구 또는 포유 동물 CCR2를 발현하는 세포에 대하여 내피통과 이주가 모니터될 수 있다. 이러한 구체예에서, 내피 세포층을 통한 이주가 평가된다. 세포층을 제조하기 위하여, 내피 세포는 내피 세포의 부착을 용이하게 하기 위하여 콜라겐, 피브로넥틴, 또는 다른 세포의 매트릭스 단백질과 같은 물질로 임의로 코팅된 미공성 필터 또는 막에서 배양될 수 있다. 바람직하게, 내피 세포는 컨플루언트(confluent) 단층이 형성될 때까지 배양된다. 단층 형성에 이용할 수 있는 다양한 포유 동물 내피 세포는 예를 들어, 정맥, 동맥, 또는 미세혈관 내피, 이를 테면 인간 배꼽 정맥 내피 세포 (Clonetics Corp, San Diego, Calif)를 포함한다. 특정 포유 동물 수용체에 대한 반응으로 화학주성을 평가하기 위하여, 동일한 포유 동물의 내피 세포가 바람직하나; 이종의 포유 동물 종 또는 속으로부터의 내피 세포 또한 사용될 수 있다.

<90> 일반적으로, 필터의 첫번째 표면으로부터 필터의 반대쪽 두번째 표면을 향해 증가된 수준의 화합물 방향으로, 막 또는 필터로 또는 이를 통한 세포의 방향성 이주를 검출하여 분석법이 수행되며, 여기에서 필터는 제1 표면에 내피 세포층을 함유한다. 방향성 이주는 막으로 또는 이를 통하여, 필터의 반대면에 위치한 화합물을 향해 제1 표면에 근접한 영역으로부터 발생한다. 제2 표면에 근접한 영역에 존재하는 화합물의 농도는 제1 표면에 근접한 영역의 농도보다 더 크다.

<91> 항체 억제제에 대하여 시험하기 위하여 사용되는 일 구체예에서, 이주 및 포유 동물 CCR2 수용체를 발현할 수 있는 조성물이 제1 챔버에 위치될 수 있다. 제1 챔버에 세포의 화학주성을 유도할 수 있는 하나 이상의 리간드 또는 프로모터를 포함하는 조성물 (화학주성을 갖는)을 제2 챔버에 둔다. 바람직하게, 세포를 제1 챔버에 두기

직전에 또는 세포와 동시에, 바람직하게 테스트될 항체를 포함하는 조성물을 제1 챔버에 둔다. 수용체와 결합하고 본 분석법에서 리간드 또는 프로모터에 의하여 포유 동물 CCR2를 발현하는 세포의 화학주성의 유도를 억제할 수 있는 항체 또는 이의 기능적 단편은 수용체 작용의 억제제이다(예를 들어, 자극 작용의 억제제). 항체 또는 단편의 존재 하에서 리간드 또는 프로모터에 의해 유도되는 이주 정도의 감소는 억제 활성을 나타내는 것이다. 분리된 결합 연구(상기 참조)는 억제가 수용체에 대한 항체 결합의 결과인지 또는 상이한 기작을 통해 발생하는지 결정하기 위하여 수행될 수 있다.

<92> 조직에서 화합물(예를 들어, 케모카인 또는 항체)의 주입에 대한 반응으로 조직의 백혈구 침윤을 모니터링하는 생체 내 분석법은 생체 내 귀소의 모델이며, 이의 이주를 차단하는 항체 또는 이의 단편의 능력을 평가하기 위하여, 그리고 염증의 부위로의 이주 및 화학주성에 의하여 리간드 또는 프로모터에 대하여 반응하는 세포의 능력을 측정한다.

<93> 기술된 방법 외에, CCR2의 자극 기능에서 항체 또는 단편의 효과는 수용체를 함유하는 적합한 숙주 세포를 사용하여 활성이 있는 수용체에 의해 유도된 세포 반응을 모니터링하여 평가될 수 있다.

<94> 포유 동물 CCR2 기능의 추가의 리간드 및 억제제의 확인

<95> 본 발명의 항체 및 단편의 결합 및 작용을 평가하기 위하여 사용될 수 있는 상기 기술된 분석법을 사용하여 포유 동물 CCR2 또는 이의 기능적 변이체, 및 포유 동물 CCR2 작용의 억제제 및/또는 프로모터와 결합하는 추가의 리간드 또는 다른 물질을 확인할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 이의 기능적 부분의 것과 동일하거나 유사한 결합 특이성을 갖는 제제는 상기 항체 또는 이의 부분을 사용하는 경쟁 분석법으로 확인될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 수용체의 리간드 또는 포유 동물 CCR2 단백질과 결합하는 다른 물질 및 수용체 작용의 억제제(예를 들어, 길항제) 또는 프로모터(예를 들어, 작용제)를 확인하는 방법을 포함한다. 일 구체예에서, 포유 동물 CCR2 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 지니는 세포(예를 들어, 백혈구, 세포주 또는 세포로 도입된 핵산에 의해 암호화된 포유 동물 CCR2 단백질 또는 기능적 변이체를 발현하도록 설계된 적합한 숙주 세포)를 본 분석법에서 사용하여 수용체 기능의 억제제 또는 프로모터를 포함하는, 수용체에 결합하는 리간드 또는 다른 물질의 효능을 확인하고 평가할 수 있다. 이러한 세포는 또한 발현된 수용체 단백질 또는 폴리펩티드의 작용을 평가하는 데 유용하다.

<96> 본 발명에 따라서, 수용체, 수용체의 억제제 및 프로모터와 결합하는 리간드 및 다른 물질이 적합한 분석법에서 확인될 수 있으며, 치료 효과에 대하여 추가로 평가될 수 있다. 수용체 기능의 억제제를 사용하여 수용체 활성을 억제시키는데(줄이거나 방지시키는) 사용될 수 있으며, 리간드 및/또는 프로모터는 지시된 정상 수용체 기능을 유도하는(기폭시키거나 증진시키는) 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 개체(예를 들어, 포유 동물)에 수용체 작용의 억제제를 투여하는 것을 포함하여, 이식편 거부를 치료하는 방법을 제공한다.

<97> **CCR2 길항제를 포함하는 약제학적 조성물**

<98> 본 발명은 CCR2의 전사, 발현 또는 활성을 조절하기 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 약제학적으로 허용가능한 담체와 CCR2의 발현 또는 활성을 조절하는 제제를 제제화하는 것을 포함한다. 이러한 조성물은 부가적인 활성 제제를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체와 CCR2의 발현 또는 활성을 조절하는 제제 및 하나 이상의 추가의 활성 화합물을 제제화하여 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 추가로 포함한다.

<99> 노출되는 세포 또는 포유 동물에 대하여 비독성인 용량 및 농도로 약제학적으로-허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제가 사용된다. 종종 생리적으로 -허용가능한 담체는 pH 완충 수용액이다. 생리적으로 허용가능한 담체는 완충액, 이를 테면 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 이를 테면 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 이를 테면 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 이를 테면 글리신, 글루타민, 히스타딘, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 단당류, 이당류 및 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 이를 테면 EDTA; 당 알코올, 이를 테면 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 이를 테면 소듐; 및/또는 비이온성 계면 활성제, 이를 테면 TWEEN®, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), PLURONICS® 및 히아루론산(HA)을 포함한다.

<100> 제제는 CCR2의 길항제의 안정성을 최적화하기 위하여, 또는 혈류에 대한 활성 물질의 지속 또는 연장 방출이 허용되도록 설계될 수 있다. CCR2 길항제의 각각의 타입 및 투여 경로에 적합한 제제는 예를 들어, 문헌["Remington: The Science and Practice of Pharmacy", A. Gennaro, ed., 20th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000]에서 찾을 수 있다.

- <101> 제제가 생체 내 투여에 사용되기 위하여는 멸균되어야 한다. 제제는 동결 건조 및 재구성 이전, 또는 이후에 멸균 여과 막을 통한 여과에 의하여 멸균될 수 있다. 본원의 치료적 조성물은 일반적으로 멸균 수용 포트, 예를 들어, 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의하여 뚫을 수 있는 스톱퍼(stopper)를 갖는 바이얼을 갖는 컨테이너에 위치한다. 치료적 조성물은 본 분야에 알려진 의료 장치로 투여될 수 있다.
- <102> **치료 방법**
- <103> 대상에서 섬유증을 치료하는 본 발명의 방법은 기관 특이적 섬유증 또는 전신 섬유증을 포함한다. 기관 특이적 섬유증은 폐 섬유증, 간 섬유증, 신장 섬유증, 심장 섬유증, 혈관 섬유증, 피부 섬유증, 눈 섬유증, 골수 섬유증, 또는 다른 섬유증 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 상기 폐 섬유증은 특발성 폐 섬유증, 약물 유도된 폐 섬유증, 천식, 사르코이드증 또는 만성 폐쇄성 폐 질환 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 상기 간 섬유증은 경화증, 주혈흡충증(schistosomiasis), 또는 담관염 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 상기 경화증은 알코올성 경화증, C형 간염-후 경화증, 원발성 담즙성 간경화증으로부터 선택될 수 있다. 상기 담관염은 경화성 담관염이다. 상기 신장 섬유증은 당뇨병콩팥병증 또는 루프스 사구체경화증 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 상기 심장 섬유증은 심근 경색증의 적어도 하나의 타입과 관련될 수 있다. 상기 혈관 섬유증은 혈관형성술 후 동맥 재협착 또는 죽상경화증 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 상기 피부 섬유증은 화상 흉터 형성, 비대 흉터 형성, 켈로이드 또는 신원성 섬유화 피부병 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 상기 눈 섬유증은 안구-후방 섬유증, 백내장후(postcataract) 수술 또는 증식성 유리체망막병증 중 하나와 관련될 수 있다. 상기 골수 섬유증은 특발성 골수섬유증 또는 약물 유도된 골수섬유증 중 적어도 하나와 관련될 수 있다. 다른 섬유증은 페로니병, 뒤피트렌구축 또는 피부근육염으로부터 선택될 수 있다. 전신 섬유증은 전신 경화증 및 이식편 대 숙주 질환으로부터 선택될 수 있다.
- <104> **환자 평가**
- <105> 간질성 폐 질환 (ILD)은 유사한 임상적, 방사선, 생리적, 또는 병리적 소견 때문에 함께 그룹화되는 다른 범위의 섬유증 장애를 포함한다. 더욱 정확한 용어, 광범위 실질 폐 질환은 대부분의 이들 장애가 종말세기관지, 간질 및 폐포염에 영향을 미치기 때문에 덜 혼돈된다.
- <106> IPF가 "폐렴"으로 불리지만, 염증은 상대적으로 적은 역할을 수행하는 것으로 보인다. 환경적, 유전적 또는 다른 알려지지 않은 인자들이 초기에 파리 상피 세포 손상을 기폭시키는 것으로 생각되나, 자기-영속성 및 이상 간질성 섬유모세포 및 중간엽 세포 증식 (콜라겐 침착 및 섬유증과 함께)은 임상 질환의 발달 원인인 것으로 생각된다. 주요한 조직학적 발견은 섬유모세포 증식의 부위 (섬유모세포 자리) 및 조밀 흉터형성을 갖고, 선택적으로 정상 폐 조직의 영역(이질성)을 갖는 흉막하 섬유증이다. 산란된 간질성 염증은 림프구, 혈장 세포 및 조직구 침윤에서 발생한다. 말초 파리 (벌집 모양)의 낭 확장증이 모든 환자에서 발견되며, 질환 발달에 따라 증가한다. Merck Manual of Diagnosis and Therapy (18th ed.), Section: Pulmonary Disorders, Subject: 간질성 Lung Diseases, Topic: Idiopathic Interstitial Pneumonias. 2006 참고.
- <107> 광범위(Diffuse) 폐 질환, 이를 테면 만성 폐쇄성 폐 질환 및 폐동맥 고혈압은 ILD 분류에서 배제된다. 진행성 ILD를 갖는 환자는 초혈압곤란으로부터 고통받으며, 최종적으로 호흡 장애로 죽는다. 간질성 폐 질환은 호흡 불충분 및 상당한 수의 환자에서 사망을 유발하는 장애의 이질성 그룹을 포함한다. 폐 이식은 후보자 선택에서 치료적 옵션이다. 일반적 집단에서 ILD의 정확한 발생수 및 유병률은 알려지지 않은 채로 있다. ILD가 이전에 기록된 것보다 훨씬 더 우세한 것으로 여겨진다 (100 000 집단 중 5 사례). Bernalillo County, New Mexico에서의 집단-기초의 연구에서 남성 100 000명 당 80.9 사례의 유병률 및 여성 100 000명 당 67.2 사례의 유병률이 기록되었다. 특발성 폐 섬유증 (IPF)은 본 연구의 모든 경우의 약 45%에 해당하는 ILD의 가장 공통적인 형태이다. 호흡 장애를 유발할 수 있는 다른 광범위 폐 질환은 사르코이드증, 림프관평활근종증, 랑게르한스섬 조직구증 또는 호산구 육아종 박리성 간질성 폐렴 (DIP), 비특이적 간질성 폐렴 (NSIP) 및 연결 조직 질환과 관련된 폐 섬유증을 포함한다.
- <108> 항-CCR2 치료법의 필요에 대한 간질성 특발성 폐 섬유증 환자 (UIP/IPF, 또는 NSIP 환자)의 평가를 본 분야의 숙련자에게 알려진 방법을 사용하여 질환의 징후 제시 이전, 동시, 또는 이후의 임의의 시간에 수행할 수 있다. 일반적으로, 폐 질환을 진단하는 데 사용되는 방법은 심각성, 예를 들어, 기계적 환기에 대한 필요; 징후, 이를 테면 기침, 호흡곤란, 열, 객혈; 발병 타입, 점진적, 급성 또는 아급성; 내재하는 질환, 면역결핍, 콜라겐 혈관 질환, 혈관염; 환경적 노출, 석면, 조류 항원, 독성 증기; 투약 경험, 코르티코스테로이드, 세포독성제, 항생제; 실험실 이상, 빈혈, 증가된 혈청 호산구 계수, 항호중구 세포질 항체, 아스페르길루스에 대한 혈청 침전소, 류마티스 인자; 방사선 발견, 정상, 광범위 또는 국부화 불투명도, 결절성 또는 반점형 경화, 공간 또는

간질성, 상부 또는 하부 엽 우세형; 및 방사선 촬영 (HRCT)에 의해 발견될 수 있는 가슴막 삼출, 젓빛유리, 기관지확장증, 기도 질환의 증거, 하부 엽, 흉막하, 미세 낭포성, 또는 벌집모양 변화, 양측성 상부 엽 낭 및 결절, 양쪽성으로 광범위 낭 변화를 포함한다. 최종적으로, 병태생리학이 폐쇄성, 제한성, 혼합된 폐쇄성 또는 제한성, 또는 정상인지 결정하기 위하여 환자의 폐 기능을 테스트한다.

- <109> IPF (UIP) 환자에서의 조직학적 발현은 불규칙 선형 불투명도 (그물 패턴)를 포함한다. 그러나 이러한 관찰은 콜라겐 혈관 질환, 석면증 및 만성 과민성 폐렴에서 발생할 수 있다. 원위 폐 실질(Distal lung parenchyma)은 UIP에서 벌집 모양 패턴을 갖는 섬유증을 가질 것이다. 간질성 섬유증의 다른 형태는 림프구성 간질폐렴, 콜라겐 혈관 질환, 약물 반응, 진폐증 (석면증, 베릴륨중독증, 규폐증, 경질 금속 폐면지증 등), 사르코이도시스, 랑게르한스 세포 조직구증 (호산구성 육아증), 만성 육아증 감염, 만성 흡인, 만성 과민성 폐렴, 기질화된 만성 호산구성 폐렴, 기질화된 및 기질화하는 광범위 파리손상, 만성 간질성 폐 부종/수동 울혈, 방사선 조사 (만성), 치료된 감염성 폐렴의 결과로 발생할 수 있다. UIP의 전형적인 HRCT 패턴은 벌집모양 및 당김 기관지확장증을 갖는 양측 기저의 말초 망상화를 포함한다. 간유리 혼탁은 질환의 특징이 아니며, 존재한다면, 통상적으로 매우 조금, 이 중 일부가 실제로 섬유증 때문일 수 있다. IPF의 가장 큰 특징으로 보이는 두 가지 특징은 IPF 진단에 대해 5.36 교차비를 갖는 하부 엽 벌집 모양 및 IPF에 대해 6.28의 교차비를 갖는 소위 "상부 엽 불규칙 선"이다 (Hunninghake 2003. Chest. 124:1215-1223).
- <110> 근육섬유모세포는 상대적으로 비-섬유성 조직에 없다. 근육섬유모세포는 폐쇄성 창상을 나타내며 이들 세포에게 수축 표현형을 제공하는 평활근 액틴 섬유를 함유한다. 알파-평활근 액틴 (αSMA)은 근육섬유모세포에 대한 마커이다. TGFβ1은 이전에 αSMA 발현을 유도하는 것으로 나타난 원형 전섬유성 성장 인자 (prototypic profibrotic growth factor)이다 (Desmouliere et al. 1995 Exp Nephrol 3(2): 134-9). UIP로부터 배양된 섬유모세포 및 비-섬유성 폐로부터 섬유모세포를 사용하여, 본 출원인은 TGFβ 1이 비-섬유성 및 섬유성 섬유모세포에서 αSMA를 유도하나, 섬유성 섬유모세포에서 유도의 세기가 더 큰 것을 발견하였다. PDGF를 사용한 섬유모세포의 자극은 섬유성 섬유모세포에서만 αSMA 발현의 완만한 증가 (10-배 미만)를 유도한다. 이들 셋 중에, 출원인 데이터는 CCL2만이 10-배 이상으로 섬유성 섬유모세포에서 αSMA 발현의 증가를 유도하는 것을 나타내었다.
- <111> 콜라겐 침착은 섬유증 및 이전에 UIP와 관련이 있는 것을 나타낸 두개의 유전자, 프로콜라겐 I 및 프로콜라겐 III에 대한 중요한 특징이다. 프로콜라겐 I 및 III 단백질은 폐 및 전신에 둘 모두의 UIP 샘플에서 증가되는 것으로 보인다 (Low et al. 1992 Am Rev Respir Dis 146(3):701-6; Strieter et al. 2004 Am J Respir Crit Care Med 170(2): 133-40; Bensadoun et al. 1996. Am J Respir Crit Care Med 154(6 Pt 1): 1819-28.). 출원인은 CCL2가 UIP 섬유모세포에서 프로콜라겐 I 및 프로콜라겐 III를 유도하는 것을 증명하였다. 또한, CCL2에 의한 유전자 유도의 세기는 전섬유성 사이토카인 TGFβ 1 및 PDGF-AB 둘에 의해 생성된 것에 필적한다.
- <112> TGFβ 1의 전섬유성 역할은 다양한 조직 및 기관에 잘 기술되어 있다. TGFβ 1 효과는 자가 분비 기작을 통하여 추가로 증폭된다. 출원인은 TGFβ 1으로 자극된 비-섬유성 및 섬유성 폐 섬유모세포 둘 모두에서 TGFβ 1의 존재 하에서 증가된 TGFβ 1을 보유하는 두 세포 타입 만큼 많은 증폭 기작을 관찰하였다. CCL2는 또한, TGFβ 1 유전자 발현을 증진시키며, TGFβ 1과 같이, CCL2에 의한 TGFβ 1 유전자 유도의 정도가 섬유성 섬유모세포에서 더 큰 것으로 발견되었다. TGFβ 수용체는 공피증 환자로부터의 피부 섬유모세포에서 증가되는 것으로 이전에 관찰되었다 (Kubo et al. 2002J Rheumatol 29(12):2558-64; Kawakami 1998. J Invest Dermatol 10(1):47-51). TGFβ 1, PDGF 및 CCL2와 함께 인큐베이션된 UIP 섬유모세포는 비-섬유성 섬유모세포에서의 것에 대하여 분석된 TGFβ 수용체 서브유닛 둘 모두에서 증가하는 한편, TGFβ 1은 TGFβRI를 주로 증가시키고, CCL2는 두 서브유닛을 유도하였으며, 이는 효과가 CCL2에 의한 TGFβ 1 유도 때문만이 아닐 수 있다는 것을 나타낸다.
- <113> 연결 조직 성장 인자 (CTGF)는 콜라겐 생성을 포함하는 많은 TGFβ 1의 효과를 매개하는 것으로 보인다. TGFβ 1은 섬유성 및 비-섬유성 섬유모세포에서 CTGF 유전자 발현의 증가를 유도하였다. 또한, PDGF 및 CCL2는 UIP 섬유모세포에서 CTGF 유전자 발현 증가를 유도하였다.
- <114> 출원인 데이터는 TGFβ 1, PDGF 및 CCL2가 UIP 섬유모세포에서 IL13Ra1 발현을 증진시키는 것을 나타낸다. IL-13은 UIP 환자의 폐에서 증진된 수준으로 발견되는 Th2-형 사이토카인이다. IL-13은 시험관 내 및 생체 내 모델에서 전섬유성이다. IL-13은 콜라겐 생성 및 섬유모세포의 증식을 유도한다 (Szaito 2003. Int Arch Allergy Immunol 2003;132(2): 168-76; Ingram 2004 Faseb J 18(10): 1132-4). 다양한 뮤린 폐 섬유증 모델 데이터는 IL-13이 전섬유성일 IL13Ra2를 통해 신호를 전달하고, TGFβ 1의 유도를 통하여 활동할 수도 있는 것을 나타낸다 (Fichtner-Feigl 2006. Nat Med 12(1):99-106). 따라서, TGFβ 1, PDGF-AB 및 CCL2 모두가 IL13Ra2

발현을 상향 조절하는 것을 나타내는 출원인 데이터는 CCL2가 직접적으로, 또는 간접적으로 섬유모세포가 IL-13 매개의 반응에 더욱 민감하게 할 수 있는 것을 나타낸다.

- <115> 종합하여, 출원인은 먼저 UIP 섬유모세포에 의한 CCL2에 대한 전섬유성 반응의 특징을 기술하였으며, 비-섬유성 폐에서의 것으로부터의 UIP 섬유모세포의 반응을 구별하였다. 이전의 연구는 CCR2가 공피증 환자 피부의 근섬유모세포-유사 세포에서 발현되는 것을 나타내었으며 (Carulli 2005 Arthritis Rheum 52(12):3772-82), 폐 섬유증의 동물 모델은 섬유증으로부터 분리된 섬유모세포에서 CCR2의 상향 조절, Th2-형 환경 및 CCR2 리간드에 대한 이들 세포의 증가된 작용성을 나타내었다 (Hogaboam 1999. J Immunol 1999;163(4):2193-201.). 그러나 이는 폐 섬유모세포 질환에서 CCL2에 대한 전섬유성, 작용적 역할을 나타내는 제일 처음 알려진 연구이다.
- <116> CCR2-CCL2의 억제제 섬유증의 생체 내 모델에서 유익한 것으로 보인다. 기계적으로, 동물 모델에서 섬유증의 억제는 섬유 세포 사용을 감소시키고, 인간 질환으로 번역될 수 있거나 그렇지 않은 염증을 약화시키는 데 기여한다. 본 발명은 CCR2 리간드 CCL2가 전섬유성 반응을 구동할 수 있으며 UIP 섬유모세포가 CCL2에 대하여 초-반응성인 것을 나타내기 위한 출원인의 인간 섬유모세포의 사용을 기초로 한다. 따라서, 데이터는 특히 CCR2에 대한 CCL2의 길항 작용에 의하여 CCR2 생물반응성을 차단, 억제, 하향 조절, 또는 길항시키는 방법이 출원인이 인간 폐 섬유모세포 질환에서 CCL2의 직접적 전섬유성 효과를 확립한 바와 같이 폐 기능의 손상을 유발하는 간질성 폐 조직에 대한 빠르고 비가역적인 손상에 효율적일 것이라는 것을 나타낸다.
- <117> 본 발명의 방법에서, CCR2 길항제는 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF를 포함하나 이에 한정되지 않는 본원에 개시된 바와 같은 검출가능한 마커 UIP의 발병 시에 투여될 수 있다.
- <118> IID, 특히 IPF의 진단 및 관리에 관한 본 분야의 현재 지식은 세포 병리학만큼 다양한 섬유증을 유발하는 원인 및 시작 사건을 나타낸다 (Chapman 2004 J Clin Invest 113(2): 148-157). 어떤 진단된 환자의 하위 세트가 항-CCL2 치료법에 의해 도움을 받을 수 있는지 결정하기 위하여, CCL2 매개의 질환과 관련된 생물마커의 확인이 가치가 있을 것이다. IPF 조직으로부터의 연구는 유전자 발현 수준에서 MMP-7의 상향 조절의 차별적인 조절을 나타내었으며, 일부 단백질은 KL-6, ENA-78, IP-10, CCL7, IL-2, IL-8, IL-10 및 IL-12 (p40)를 포함하는 혈청 및/또는 기관지 세척 액에서 상향 조절되는 것을 나타내었다. 그러나 현재까지 이들 단백질과 CCL2 약화 사이에 상관 관계가 없었다. CCL2 외에 일부 사이토카인, 이를 테면 IL-1, PDGF, 오스테오폰틴, TNF, TGF, CCL3, CXCL8, CXCL5, CXCL12, CXCL9, CXCL10, CXCL11이 IPF의 발병기전에 관여하는 것으로 보인다. 그러나 CCL2와의 관계는 불분명한 채로 남아있으며, IPF 환자로부터의 섬유모세포의 유전자 발현 분석은 지금까지 상이한 실험실에서 상이한 결과를 나타내었다 (Studer et al. 2007. Proc Amer Thoracic Soc. 4(1): p. 85-9 참고).
- <119> 배양된 섬유모세포는 검출가능한 기저 수준의 CCL2를 가지며, 외인적으로 첨가된 CCL2가 IL-6 생성을 조절하는 것으로 최근 알려졌다 (Liu, X., et al. 2007 Amer J Respir Cell Molec Biol. 37(1): 121-8). 따라서, CCL2는 중심 매개자로서 행동하며, IPF 섬유모세포의 환경에서 CCL2의 중화는 다른 유전자 및/또는 단백질의 발현을 조절할 것이다.
- <120> 출원인은 섬유성 환자로부터 분리된 잔류 섬유모세포를 사용하여, IPF 환자로부터의 폐 섬유모세포가 비-섬유성 섬유모세포보다 더 높은 수준의 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF를 발현하는 것으로 결정하였다. 출원인은 또한, CCL2 항체를 중화하는 CNTO 888이 가장 높은 수준을 발현하는 세포에서 이들 단백질의 생성을 차단할 수 있는 것으로 결정하였다.
- <121> IPF의 정확한 진단은 폐 조직의 생검 및 비통상형 간질폐렴에 대한 조직학적 분석을 수반한다. 이 과정의 침투성 때문에, 초기 진단 후에 통상적으로 질환 진행을 모니터링하는 데 실용적이지 않을 것이다. 다른 비침투성 진단이 유용하나, 가변성이 있다. 따라서, 상대적으로 비-침투성 정량적 진단 도구가 필요하다. 조직 유체, 이를 테면 혈청 또는 기관지 파리 세척액이 외과적 생검보다 덜 침투적으로 샘플링될 수 있다. 수집된 세포로부터 가용성 단백질 및 세포 표면 마커 또는 유전자 발현은 모두 존재하는 기술과 함께 정량화되어, 질환 진행을 진단하고 모니터링할 수 있다. 이들 유전자 및/또는 단백질을 위한 조직의 모니터링은 CNTO 888에 의한 CCL2 중화의 정도를 결정하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 접근가능한 말초 조직으로부터의 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF에 대한 유전자 및/또는 단백질 결정은 질환 및 표적 중화의 신규하고 상대적으로 비-침투성인 생물 마커를 제공할 것이다.
- <122> 환자를 평가하기 위한 일 구체예에서, 환자 혈액의 5 ml 이상을 핵산 분석을 위해 설계된 튜브, 이를 테면 PAXgene Blood RNA 튜브 (SystemPreAnalytiX)로 빼내고, 총 RNA가 분리되고 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF 중 적어도 하나에 대하여 특이적인 특정 프로브를 포함하는 본 분야에 알려진 임의의 방법

에 의해서와 같이 유전자 발현에 대하여 분석될 수 있다. 모든 또는 임의의 유전자가 특발성 간질폐렴을 지닌 환자의 징후를 나타내지 않는 정상 대상 또는 환자로부터의 나이 및 성별을 맞춘 표본의 2-배 이상의 발현 수준을 갖는다면, 환자가 치료법을 위하여 선택될 수 있다. 또다른 구체예에서, 치료법을 위하여 선택된 환자를 위한 용량 선택은 나이 또는 성별을 맞춘 정상 지원자의 것과 비교하여 임의의 또는 모든 유전자의 2-배 이상의 발현 변화에 기초하여 조정될 수 있다. 본 발명의 방법의 또다른 구체예에서, 치료법에 대한 반응은 나이 및 성별을 맞춘 정상 지원자에 하여 임의의 또는 모든 유전자의 2-배 이상의 발현 변화에 기초하여 모니터링될 수 있다.

<123> 또다른 구체예에서, 5 ml 이상의 혈액을 특발성 간질폐렴의 징후를 나타내는 환자로부터 혈청 수집 튜브로 수집할 수 있다. 혈청은 상업적으로 이용가능한 멀티플렉스 또는 ELISA 키트를 사용하여 임의의 또는 모든 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF에 대하여 시험될 수 있다. 임의의 또는 모든 단백질이 나이 및 성별을 맞춘 지원자의 2-배 이상의 발현 수준을 갖는다면 환자는 치료법에 대하여 선택될 수 있다. 또다른 면에서, 치료법을 위해 선택된 환자를 위한 용량 선택은 나이 및 성별을 맞춘 정상 지원자의 것과 비교하여, 임의의 또는 모든 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF의 2-배 이상의 발현 변화에 기초하여 조정될 수 있다. 추가의 면에서, 치료법에 대한 반응은 나이 및 성별을 맞춘 정상 지원자의 것과 비교하여, 임의의 또는 모든 CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 및 G-CSF의 2-배 이상의 발현 변화에 기초하여 모니터링될 수 있다.

<124> 투여 경로

<125> 투여 경로는 공지 및 허용된 방법, 예를 들어 문맥을 통한 정맥내, 복막내, 근육내, 동맥내 주사 또는 주입; 서방형 또는 연장-방출형 수단에 의한 국소 투여; 국소 적용, 비강 스프레이, 좌약 등을 통한 점막 관통 또는 경피 전달에 의한 피하 주사에 따르거나, 경구로 투여될 수 있다.

<126> 본 발명의 다른 면에서, 투여는 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 낭내, 연골사이, 공동내, 강내, 뇌내, 뇌실내, 대장내, 경부내, 위내, 간내, 심장 근육내, 골내, 골반내, 심막내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 결장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활액내, 흉곽내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질, 결장, 협측, 설하, 비내, 또는 경피에서 선택된 적어도 한가지 방식으로 투여될 수 있다.

<127> 용량

<128> 이를 필요로 하는 환자에서 만성 거부의 진행을 예방, 개선, 역행, 또는 정지시키는 데 적절한 항-CCR2 길항제의 용량은 경험적으로 찾을 것이며, 활성 제제의 효능, 제제의 강도 및 환자의 체 내에 투여 후 제제의 유효한 지속 수준에 따라 달라질 것이다.

<129> 치료 과정은 연장된 기간 동안 초기 치료 효과 (활성)을 유지하기 위하여 급성 방식에 반대되는 연속적 방식으로 장기간에 걸쳐 또는 연속적 투여될 수 있다. 또는 치료는 사실상 급성 길항제 활성 기간 이후 환자의 체 내에서 더 낮은 길항제 활성이나 길항제 활성이 없는 기간을 제공하도록 때때로 중단되거나 순환할 수 있다. 따라서, 투여 스케줄은 항체가 임의의 주 수 동안, 주마다 1회, 2회, 3회 이상 투여될 수 있도록 하거나 항체가 1주에 한번, 매 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 주에 한번 발생하는 투여와 함께 1회 이상 (예를 들어, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회) 투여되도록 다양할 수 있다.

<130> CCR2 생물 활성의 단일 클론 항체 길항제의 경우에, 제제는 일반적으로 수여자의 체중에 기초한 양, 예를 들어, 치료 과정 당 0.1 내지 100 mg/kg으로 투여될 것이다. 본 발명의 방법에 따라 투여되는 항체의 치료적 또는 예방적 유효량에 대한 예시적인, 비-제한적인 범위는 0.1-20 mg/kg, 더욱 바람직하게 1-10 mg/kg이다. 일 구체예에서, 항-CCR2 또는 항-CCL2 항체는 약 1 내지 500 mg/m², 바람직하게 약 10 내지 400 mg/m², 약 18 내지 350 mg/m², 및 더욱 바람직하게, 약 250-280 mg/m²의 용량에 도달하도록 10 mg/분 미만, 바람직하게 5 mg/분 이하의 속도로 정맥내 주입으로 투여될 수 있다. 항-CCR2 또는 항-CCL2 항체는 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다.

<131> 배합 요법

<132> 치료

<133> 비특이적인 치료가 IPF에 대하여 유효한 것으로 입증되었다. 보조적인 치료법은 저산소혈증을 위한 O₂ 및 폐렴을 위한 항생제로 구성된다. 말기 질환은 선택된 환자에 폐 이식 자격을 줄 수 있다. 코르티코스테로이드 및

세포 독성 약물, 이를 테면 사이클로포스파미드 (CYTOXAN), 아자티오프린 (IMURAN)은 경험적으로 염증의 진행을 정지시키기 위한 시도로 실험적으로 IPF 환자에 주어졌으나, 한정된 데이터가 그들의 효능을 지지한다. 그럼에도 불구하고, 사이클로포스파미드 또는 아자티오프린 (1 내지 2 mg/kg, 1회/일)와 배합된 프레드니손 (예를 들어 DELTASONE) (0.5 내지 1.0 mg/kg 경구로 3달 동안 1회/일, 다음 3 내지 6달에 걸쳐 0.25 mg/kg 1회/일로 줄임)으로 치료를 시도하는 통상적 실시이다. 1년 동안 매 3개월 마다, 임상적, 방사선 사진술 및 생리적 반응을 평가하고, 이에 따라 약물 용량을 증가시키거나 감소시켰다. 목적 반응이 없는 경우 치료법을 정지시켰다.

<134> 항섬유화제인 피르페니돈은 폐 작용을 안정화시킬 수 있으며, 악화를 줄일 수 있다. 콜라겐 합성을 억제하는 항섬유제 (렐락신), 전섬유성 성장 인자 (수라민), 엔도텔린-1 (엔지오텐신 수용체 차단제)만이 시험관 내에서 유효한 것으로 기술되었다.

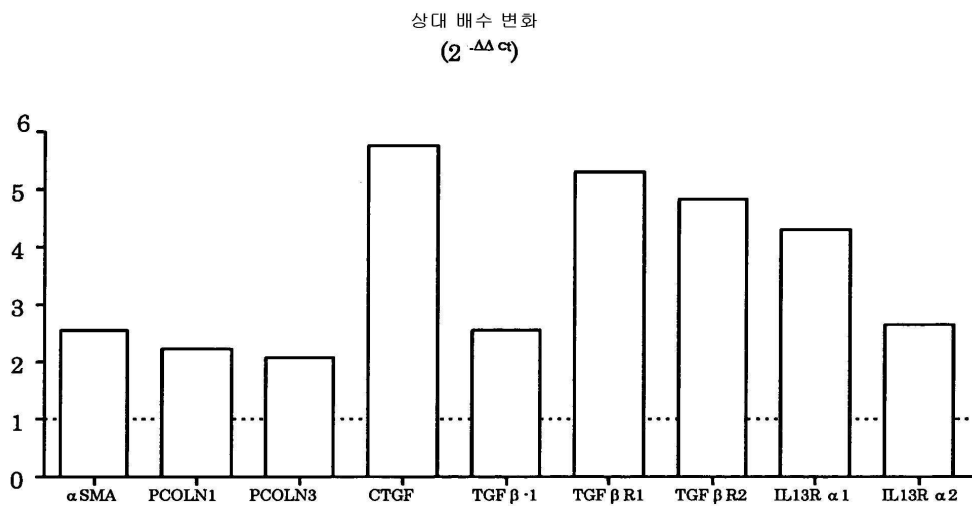
<135> 인터페론- γ -1은 소그룹의 환자에서 프레드니손과 배합되는 경우 가망이 있으나, 더 큰 이중맹 다국적 무작위 시도는 진행이 없는 생존 기간, 폐 기능 또는 삶의 질에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

<136> 일반적 용어로 본 발명을 기술하면서, 본 발명의 구체예는 다음 실시예에 추가로 개시될 것이다.

도면

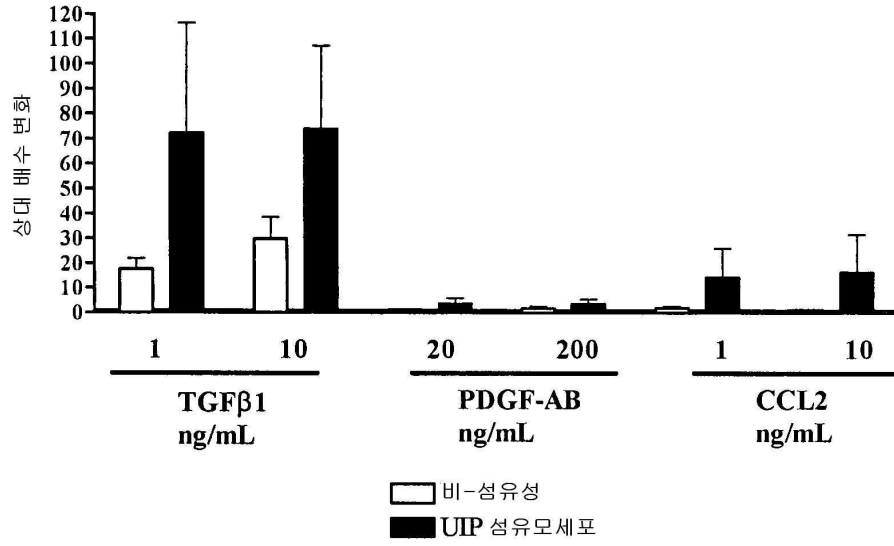
도면1

도 1



도면2

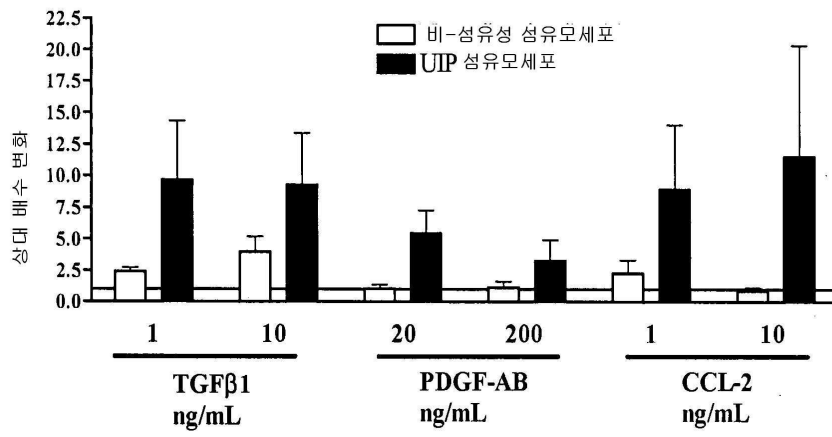
도 2



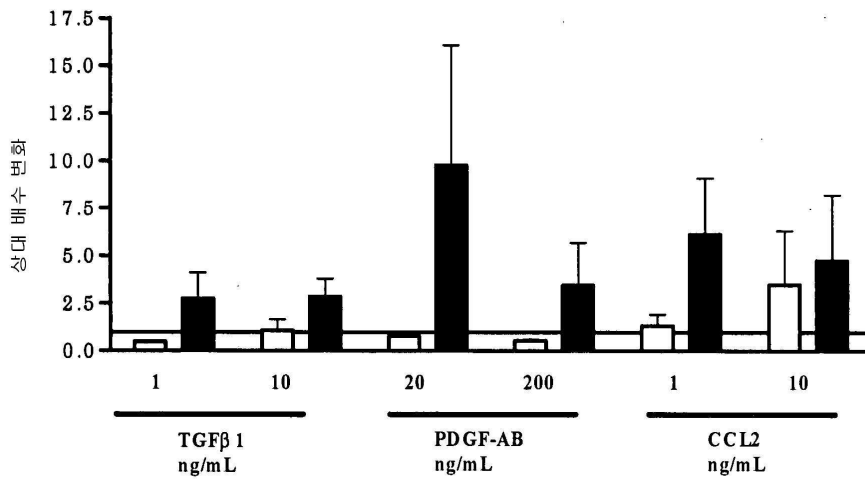
도면3

도 3

A.

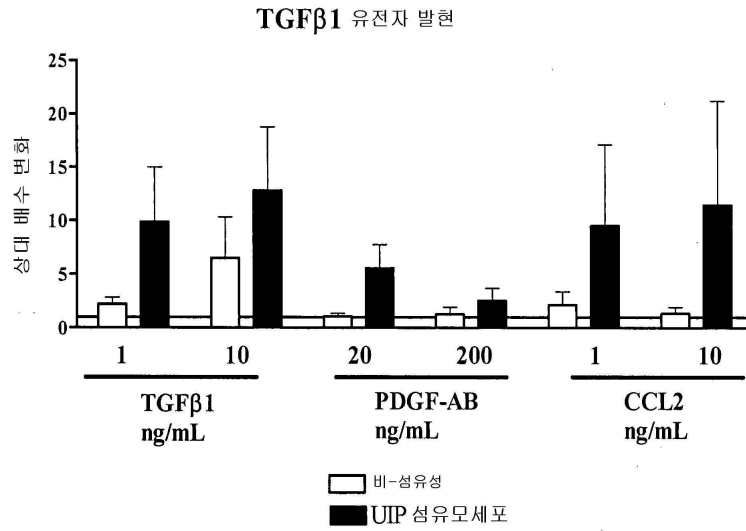


B.



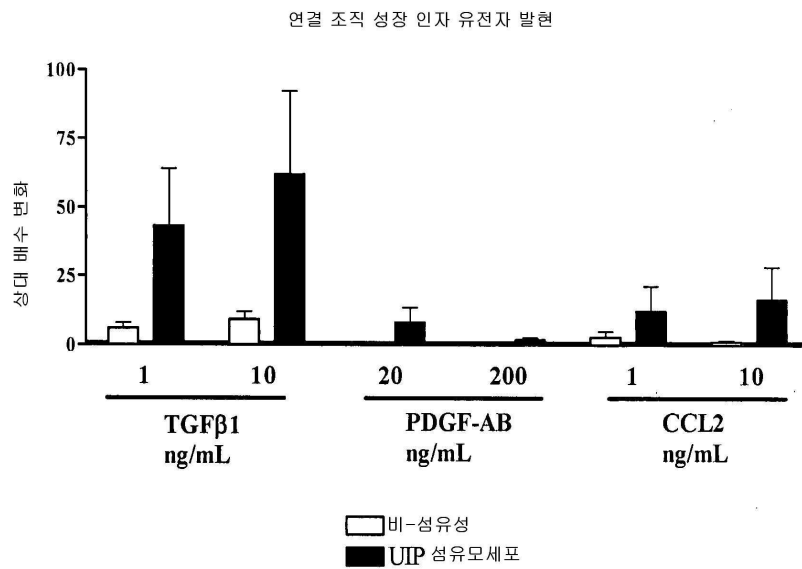
도면4

도 4



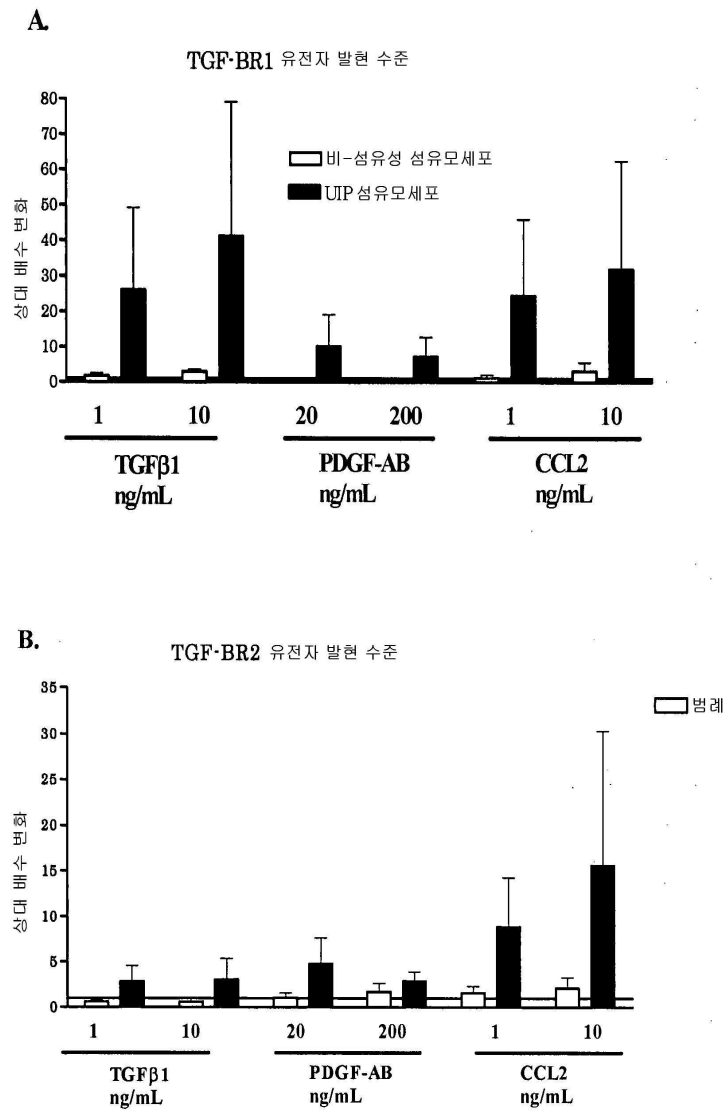
도면5

도 5



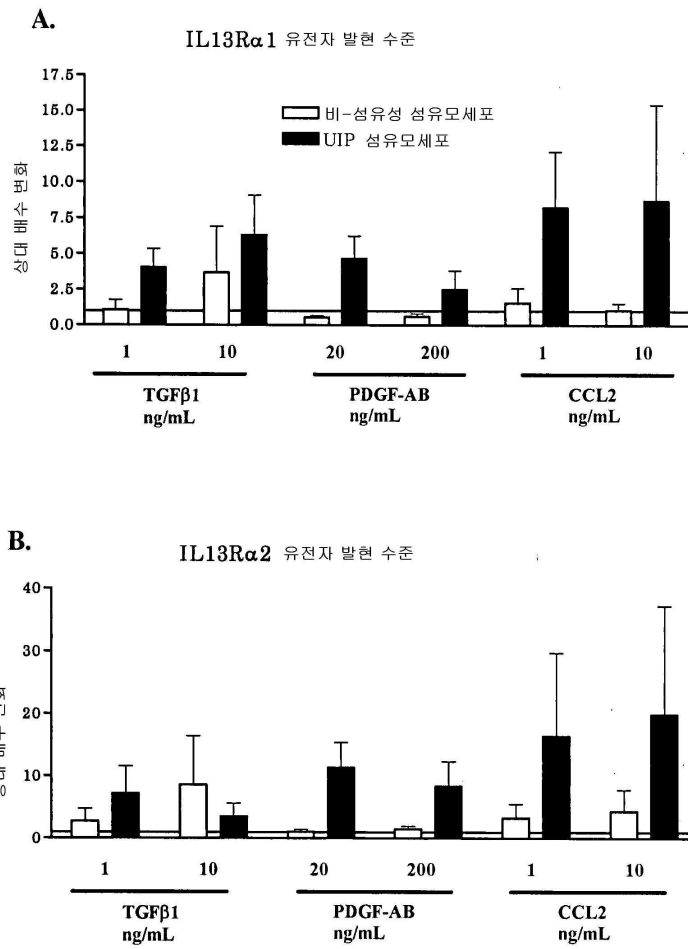
도면6

도 6



도면7

도 7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Anuk DAS
Lynn MURRAY
Fahrat SYED

<120> CCR2 ANTAGONISTS FOR TREATMENT OF
FIBROSIS

<130> CEN5158 PCT

<140> US 60/828,253
 <141> 2006-10-05

<160> 28

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1, 41, 43
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 1
 Xaa Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
 1 5 10 15
 Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
 20 25 30
 Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Xaa Ile Xaa Lys Thr Ile Val Ala
 35 40 45
 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
 50 55 60

 Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
 65 70 75

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 50, 52, 54, 55, 57, 58, 59
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 2
 Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 89, 91, 92, 93, 96, 97
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 5

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val
 20 25 30

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

Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa
 85 90 95

Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 6

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 7
 Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln
 1 5 10 15
 Lys Phe Gln Gly
 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 8
 Trp Met Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Gly His Thr His Tyr Ala Gln
 1 5 10 15
 Lys Phe Gln Gly
 20

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 9
 Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 10
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 11
 Trp Val Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly
 20

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 12
 Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 13
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 14
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 15
 His Gln Tyr Ile Glu Leu Trp Ser Phe
 1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 16
His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 17
His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 18
Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 19
Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 20
 Gln Thr Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala
 1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 21
 Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Gly
 1 5 10

<210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 22
 Trp Met Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln
 1 5 10 15
 Lys Phe Gln Gly
 20

<210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 10, 11, 13, 15, 19
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 23
 Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Trp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa Tyr
 1 5 10 15
 Ala Ala Xaa Val Lys Gly

20

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1, 5, 6, 7, 8
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 24
 Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 2, 4, 5, 6, 9, 10
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 25
 Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 2, 5, 9
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 26
 Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr Gly Xaa Ser
 1 5 10

<210> 27
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 27
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 28
 Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His
 85 90 95
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105