



Organización y
Digitalización CSA Ltda

WOW
2005
DI

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

09-36246

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO ANTAGONISTAS DE CCR2 PARA EL TRATAMIENTO DE FIBROSIS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.

DOMICILIO HORSHAM, PENNSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C., 99/

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: Centocor Ortho Biotech Inc.

Dirección: 800/850 Ridgeview Drive,
Horsham, Pennsylvania 19044, Estados Unidos
de América.

Nacionalidad o domicilio: Horsham,
Pennsylvania, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Pennsylvania,
Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088

Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/080542

Fecha 5 de octubre de 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/060783 A3

Fecha 22 de mayo de 2008

6

TÍTULO (54) ANTAGONISTAS DE CCR2 PARA EL TRATAMIENTO DE FIBROSIS.

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/395

8

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

5 de octubre de 2006

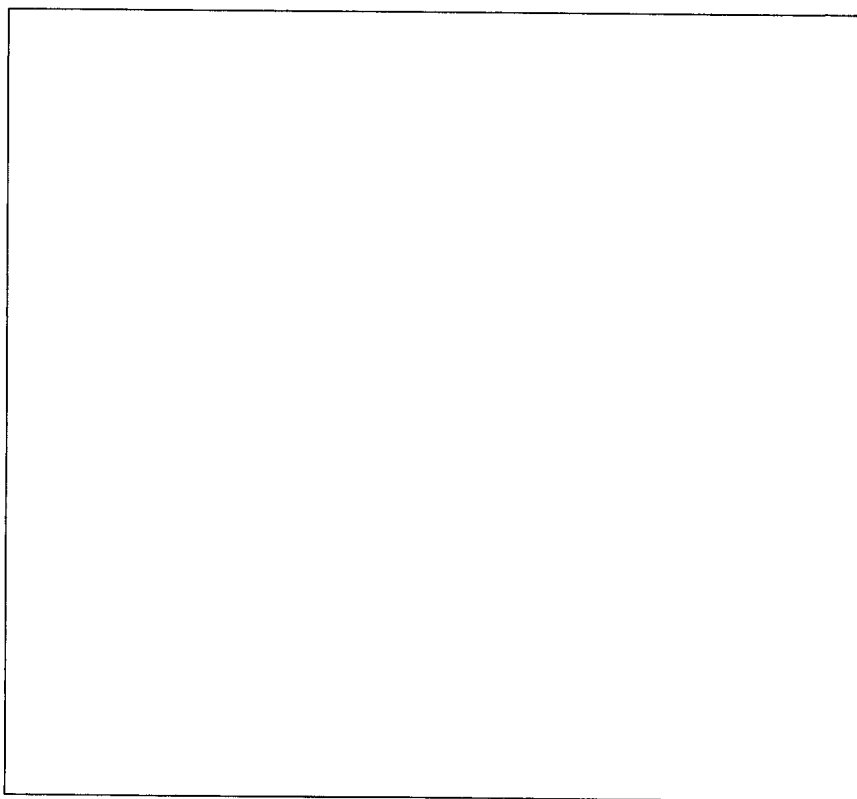
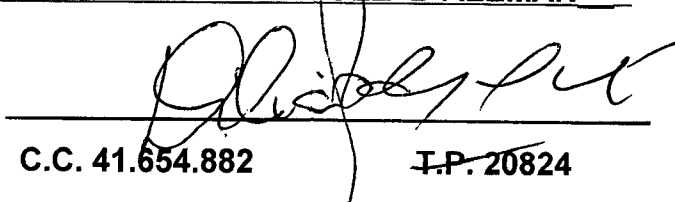
(31) Número de Solicitud

60/828,253

9

Comprobante de pago No. 09 - 25,120 // 09 - 25,157 // 09 - 25,158 **Fecha** 31 de marzo de 2009

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros Opinión escrita.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

I.P. 20824

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 25,120
FECHA : MARZO 31 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-036246- -00000-0000

Fecha: 2009-04-08 13:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODEY Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	111723194	31/03/2009	80,435,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-2153
2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 25,157
FECHA : MARZO 31 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-036246- -00000-0000

Fecha: 2009-04-08 13:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	111723194	31/03/2009	80,435,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200,000.00
		TOTAL :	\$ 200,000.00

SP/ DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 25,158
FECHA : MARZO 31 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-036246- -00000-0000

Fecha: 2009-04-08 13:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYH Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	111723194	31/03/2009	80,435,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 200,000.00

SOLO DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

ANEXOS

INVENTORES

1.)

DAS, Anuk

(1307 Berwyn-Paoli Road, Berwyn, Pennsylvania 19312, Estados Unidos de América);

2.)

MURRAY, Lynne

(733 Crooked Lane, King of Prussia, Pennsylvania 19406, Estados Unidos de América);

3.)

SYED, Farhat

(13 Billers Chase, Beualieu Park, Chelmsford, Essex CM1 6BD, Inglaterra).

RESUMEN DE LA INVENCION

Se provee terapia de antagonista anti-MCP-1/CCR2 para el control o reversión de enfermedades relacionadas con fibrosis, incluyendo, v.gr., pero sin limitarse a terapia de antagonista de MCP-1/CCR2 para la modulación de marcadores profibróticos asociados con procesos fibróticos incluyendo deposición de matriz de colágeno y colapso alveolar.

10

15

20 9B

P09/445F

ANTAGONISTAS DE CCR2 PARA EL TRATAMIENTO DE FIBROSIS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos de uso y antagonista de unión de CCL2 a CCR2, tal como un anticuerpo anti-CCL2, para la prevención y control de fibrosis pulmonar, particularmente neumonía intersticial usual.

10

DESCRIPCION DE LA TECNICA RELACIONADA

La neumonía intersticial usual (UIP, por sus siglas en inglés) es una enfermedad pulmonar intersticial debilitante crónica que es caracterizada y rutinariamente diagnosticada por la presencia de estructura en forma de panal dentro del pulmón. La estructura en forma de panal se produce debido a un incremento en la deposición de colágeno, reduciendo así la elasticidad dentro del pulmón y causando retracción y colapso final de la estructura alveolar normal. La extensión de la estructura en forma de panal y fibrosis es muy heterogénea dentro del pulmón, en donde áreas densas de exceso de colágeno a menudo se unen al parénquima pulmonar normal o tejido intersticial rico en infiltrados monocíticos. La mayoría de los pacientes tienen enfermedad clínica moderada a avanzada en el tiempo de diagnóstico y

deterioran a pesar del tratamiento.

La familia de quimiocina CXC es una familia pleiotrópica de citocinas que están implicadas en promover el tráfico de varios leucocitos, en la regulación de angiogénesis y remodelación vascular, y en la promoción de la movilización y tráfico de células progenitoras mesenquimatosas tales como fibrocitos que son células progenitoras mesenquimatosas circulantes (también conocidas como fibrocitos) en fibrosis pulmonar.

Dentro del pulmón normal, una agrupación grande de fibroblastos residentes continuamente genera y rompe el colágeno, permitiendo así que el pulmón se remodele después de infección, inflamación u otra patofisiología, y después de lesión. Los fibroblastos generan colágeno en respuesta a varios factores de crecimiento tales como TGFb1. Además, TGFb1 induce diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, que se encuentran comúnmente en tejido pulmonar de UIP. Los miofibroblastos son células diferenciadas capaces de generar colágeno así como de tener actina de músculo liso alfa y por lo tanto propiedades contráctiles. Los miofibroblastos por lo tanto pueden contribuir potencialmente a colapso alveolar. En el curso normal de la cicatrización de heridas, los fibroblastos generan colágeno y factores de crecimiento para dirigir el cierre de la herida. Una vez que la arquitectura del tejido es restaurada, la generación de colágeno por el fibroblasto disminuye y las células pasan por apoptosis, previniendo así el exceso de formación de cicatriz. Hay proliferación de fibroblastos pronunciada encontrada en los pulmones de pacientes con UIP.

Por lo tanto, los fibroblastos de UIP persisten en sitios de fibrosis, añadiendo continuamente a la deposición de colágeno excesiva aberrante. Los pacientes con UIP están entre los receptores comunes de trasplantes de pulmón y, en estos pacientes, el trasplante finalmente puede hacerse fibrótico.

5 El trabajo anterior ha mostrado diferencias fenotípicas en fibroblastos aislados de sitios de fibrosis comparado con fibroblastos aislados de tejido no fibrótico. Por ejemplo, los fibroblastos aislados de los pulmones de pacientes con UIP han incrementado la expresión de subunidades de receptor de IL-13. CCR2 se expresa sobre fibrocitos de pulmón y CCR2 regula
10 tanto el reclutamiento como la activación de estas células después de lesión respiratoria. La inhibición de señalización de CCR2 *in vivo* a través de ratones knockout para receptor o de neutralización de ligando da por resultado menos deposición de colágeno en múltiples modelos animales de fibrosis. CCL2 (ligando de CC-quimiocina 2, proteína quimioatrayente de monocitos 1,
15 MCP1) se une a CCR2. CCR2 se expresa predominantemente en monocitos, células epiteliales y células endoteliales. Los niveles incrementados de MCP1 se han descrito en pacientes con UIP. Los ligandos para el receptor CCR2 en el modelo de ratón incluyen CCL2 (también conocido como JE o proteína quimioatrayente de monocitos [MCP]-1), CCL7 (MCP-3) y CCL12 (MCP-5),
20 por lo tanto, suposiciones basadas en datos de modelo murino pueden no reflejar con precisión el ambiente pulmonar humano con respecto a distribuciones de quimiocina y de receptor de quimiocina.

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, CCL2,

ligando para CCR2, GenBank NP_002973), una proteína de 8.6 kDa que contiene 76 residuos de aminoácido, es un miembro de la familia de quimiocina-beta (o C-C) de citocinas. MCP-1 es expresada por una variedad de tipos de células incluyendo monocitos, células endoteliales vasculares, células de músculo liso, células mesangiales glomerulares, células osteoblásticas, y células epiteliales similares a tipo 2 pulmonares humanas. Se cree que MCP-1 juega un papel activo en el inicio y progresión de enfermedades inflamatorias, al promover el influjo de monocitos y activación subsecuente en tejidos. MCP-1 es quimiotáctica para monocitos pero no neutrófilos. Puede inducir la proliferación y activación de células asesinas conocidas como CHAK (asesinas activadas por CC-quimiocina), que son similares a células activadas por IL-2. Regula la expresión de antígenos de superficie celular (CD11c, CD11b) y la expresión de citocinas IL1 y IL6. MCP-1 es un activador potente de basófilos humanos, induciendo la desgranulación y la liberación de histaminas.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica médica de métodos para monitorear y manejar a pacientes que despliegan los sellos distintivos de la patofisiología que conduce a insuficiencia pulmonar conocida como UIP y que sea capaz de evitar la necesidad de trasplante de pulmón y, a un mínimo, incrementar la seguridad y supervivencia en utilización de aloinjerto, y entender y remediar las acciones patológicas de MCP-1 en el mismo.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee un método para prevenir, hacer lenta o revertir la fibrosis en un sujeto, que comprende hacer contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un antagonista de CCR2 aislado que previene las funciones biológicas o bioactividad asociada con CCR2, sus isoformas o variantes incluyendo CCR2A o CCR2B, en células que despliegan el receptor como se define aquí o antagonistas que unen MCP-1/CCL2 o CCR2 o que previenen la unión de CCR2 con su ligando(s) cognado y por lo tanto inhiben las funciones biológicas de CCR2 en la célula, tejido, órgano del sujeto mamífero. En un aspecto del método de la invención, el sujeto es un paciente que tiene una patología intersticial y fibrosis alveolar relacionada con neumonía idiopática intersticial, de manera más específica, el paciente es diagnosticado con neumonía intersticial usual.

El método de la invención se puede poner en práctica con un antagonista de CCR2 que previene las funciones biológicas o bioactividad asociada con CCR2, sus isoformas o variantes incluyendo CCR2A o CCR2B, en células que despliegan el receptor como se define aquí. En un aspecto de la invención, los antagonistas de CCR2 incluyen anticuerpos, péptidos de secuencia sintéticos o intactos y antagonistas de molécula pequeña, que unen MCP-1/CCL2 o CCR2 o que previenen la unión de CCR2 con su ligando(s) cognado y por lo tanto inhiben funciones biológicas de CCR2.

También se provee un método para diagnosticar una patología intersticial relacionada con MCP-1 y fibrosis alveolar relacionada con neumonía idiopática intersticial en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende

5 En una modalidad, las porciones de unión a ligando del anticuerpo comprenden SEQ ID NO: 27 y 28. En un aspecto, la presente invención provee por lo menos un anticuerpo anti-MCP-1 de mamífero aislado, que comprende por lo menos una región variable que comprende SEQ ID NO: 27 ó 28.

10 En otro aspecto, la presente invención provee por lo menos un anticuerpo anti-MCP-1 de mamífero aislado, que comprende ya sea (i) todas las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada ID NOS: 6, 7 y 9; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 13,
15 14 y 16.

La presente invención además provee por lo menos un método o composición de anticuerpo anti-MCP-1, para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva para modular o tratar por lo menos una condición relacionada con MCP-1 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o,
20 antes, durante o después de una condición relacionada, como se conoce en la técnica y/o como se describe aquí. En otro aspecto, la presente invención provee por lo menos un anticuerpo anti-MCP-1 de mamífero aislado, que comprende ya sea (i) todas las secuencias de aminoácidos de las regiones

determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada ID NOS: 6, 7 y 8 ó 9; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 13, 14 y 15 ó 16.

La presente invención también provee por lo menos una
5 composición, dispositivo y/o método de suministro de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de por lo menos un anticuerpo anti-MCP-1, de conformidad con la presente invención.

La presente invención además provee cualquier invención descrita aquí.

10

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra una gráfica de columnas en donde cada columna representa el número de veces de incremento en la expresión de un
15 gen asociado con fibrosis en fibroblastos de UIP en comparación con fibroblastos aislados de tejido pulmonar no fibrótico (normalizado a un valor de 1): α SMA; PCOL1; PCOL3; CTGF; TGF β -1; TGF β R1; TGF β R2; IL13Ra1; IL13Ra2.

La figura 2 es una gráfica de columnas que muestra el efecto de
20 TGF β 1, PDGF y CCL2 sobre la expresión de α SMA por fibroblastos derivados de tejido pulmonar no fibrótico y fibrótico.

La figura 3 son dos gráficas de columnas que muestran el efecto de TGF β 1, PDGF y CCL2 sobre la expresión del gen de procolágeno I (A) y

procolágeno III (B) por fibroblastos derivados de tejido pulmonar no fibrótico y fibrótico.

La figura 4 es una gráfica de columnas que muestra el efecto de TGFβ1, PDGF y CCL2 sobre la expresión del gen de TGFβ1 por fibroblastos
5 derivados de tejido pulmonar no fibrótico y fibrótico.

La figura 5 es una gráfica de columnas que muestra el efecto de TGFβ1, PDGF y CCL2 sobre la expresión del gen de CTGF por fibroblastos derivados de tejido pulmonar no fibrótico y fibrótico.

La figura 6 son dos gráficas de columnas que muestran el efecto
10 de TGFβ1, PDGF y CCL2 sobre la expresión del gen de TGFβRI (A) y TGFβRII (B) por fibroblastos derivados de tejido pulmonar no fibrótico y fibrótico.

La figura 7 son dos gráficas de columnas que muestran el efecto de TGFβ1, PDGF y CCL2 sobre la expresión del gen de IL13Ra1 (A) y
15 IL13Ra2 (B) por fibroblastos derivados de tejido pulmonar no fibrótico y fibrótico.

BREVE DESCRIPCION DEL LISTADO DE SECUENCIAS

20

<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>Descripción</u>
1	MCP-1 humana (CCL2) y variantes usadas para seleccionar enlazadores de anti-MCP-1
2	Secuencia variable de cadena pesada de VH1A: FR1, CDR1, FR2, variantes de CDR2, FR3, CDR3, FR4

5

10

15

3	Secuencia variable de cadena pesada de VH3: FR1, CDR1, FR2, variantes de CDR2, FR3, CDR3, FR4
4	Secuencia variable de cadena ligera de Kappa3: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, variantes de CDR3, FR4
5	Secuencia variable de cadena ligera de Lambda3: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, variantes de CDR3, FR4
6	VH1A CDR1 All MOR03471
7	VH1A CDR2 3781, 3790, CDR2 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	Kappa3 CDR1 All MOR03471
14	Kappa3 CDR2 All MOR03471
15	Kappa3 CDR3 3781
16	Kappa3 CDR3 3790, CDR3 888
17	Kappa3 CDR3 3899
18	Lambda3 CDR1 All MOR03548
19	Lambda3 CDR2 All MOR03548
20	Lambda3 CDR3 3744
21	Lambda3 CDR3 3747
22	Variantes de CDR2 de VH1A
23	Variantes de CDR2 de VH3
24	Variantes de CDR3 de Lk
25	Variantes de CDR3 de Lλ
26	Variantes de CDR1 de HC
27	Región variable de cadena pesada de CDR2888
28	Región variable de cadena ligera de CDR2888

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

20

Abreviaturas

Abs: anticuerpos, policlona o monoclonal; Ig: inmunoglobulina;

Mab: anticuerpo monoclonal; V: dominio variable de un anticuerpo; C:

dominio constante de un anticuerpo; H: cadena pesada de un anticuerpo; L:

cadena ligera de un anticuerpo; HRCT: tomografía computarizada de alta resolución; PDGF – AB: factor de crecimiento de plaquetas alfa/beta; CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo; CXC: quimiocina de la subclase CXC; aSMA: actina de músculo alfa-suave; PCOL1: procolágeno I; PCOL3: procolágeno III; TGFβ1: factor de crecimiento transformante beta-1; TGFβR1: receptor de TGFβ de tipo I; TGFβR2: receptor de TGFβ de tipo II; IL13Ra1: subunidad alfa 1 de receptor de interleucina-13; IL13Ra2: subunidad alfa 2 de receptor de interleucina-13.

10

Definiciones

El término "anticuerpo" aquí se usa en el sentido más amplio. Como se usa aquí, un "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno o una cadena sencilla del mismo. Por lo tanto, el anticuerpo incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero sin limitarse a por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de marco de trabajo (FR), o cualquier porción de las mismas, o por lo menos una porción de una proteína de unión, que se puede incorporar en un anticuerpo de la presente invención. El término "anticuerpo" además pretende abarcar anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones especificadas y variantes de

los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpo o que comprende porciones de anticuerpos que simulan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento o porción especificada de los mismos, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígeno a un objetivo preseleccionado. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de gozne; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite que se hagan como una cadena de una proteína individual en la cual las regiones VL y VH se parean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase v.gr., Bird et al. 1988 Science 242:423-426, y Huston et al. 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. También se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla sean abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo

se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se determinan selectivamente para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Por "CCR2" se entiende CCR2A humano (MCP-1RA, NP_000638) y/o CCR2B humano (MCP-1RB, NP_000639) y proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de una proteína CCR2 de mamífero correspondiente que ocurre naturalmente o endógena (v.gr., proteínas recombinantes). CCR2A, isoforma A, tiene C-terminal distinto y es 14 aminoácidos más largo que CCR2B, isoforma B, debido a empalme alternativo en la región codificadora que da por resultado un desplazamiento de marco y uso de un codón de detención hacia el extremo 3' (Charo, et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (7): 2752-2756). CCR2, como se define aquí, incluye proteína receptora madura, variantes polimórficas y alélicas, e isoformas de CCR2 de mamífero (v.gr., producida por empalme alternativo u otros procesos celulares), y formas modificadas o no modificadas de los anteriores (v.gr., glicosilada, no glicosilada). Dichas proteínas pueden ser recuperadas o aisladas de una fuente que naturalmente produce, por ejemplo, CCR2 de mamífero.

Un "antagonista de CCR2" previene las funciones biológicas o bioactividad asociada con CCR2A o CCR2B en células que despliegan CCR2A o CCR2B u otras isoformas o variantes como se define aquí. Los antagonistas incluidos dentro del alcance de la presente invención incluyen anticuerpos, péptidos de secuencia sintéticos o intactos y antagonistas de

molécula pequeña, que unen MCP-1/CCL2 o CCR2 o que impiden la unión de CCR2 con sus ligando(s) cognados y por lo tanto inhiben las funciones biológicas de CCR2. Por lo tanto, un inhibidor se refiere a sustancias que incluyen antagonistas que se unen a receptor (v.gr., un anticuerpo, un mutante de un ligando natural, moléculas orgánicas de peso molecular bajo, otros inhibidores competitivos de unión a ligando), y sustancias que inhiben función del receptor sin unirse al mismo (v.gr., un anticuerpo anti-idiotípico).

Por "neumonía intersticial usual" o "UIP" también se conoce clínicamente e histiológicamente como "fibrosis pulmonar idiopática" o "IPF" y "alveolitis fibrosante criptogénica". Es el más común de los seis subtipos histológicos de neumonía intersticial idiopática (IIP). Otras IIPs son: neumonía intersticial no específica (NSIP), neumonía organizante de bronquiolitis obliterante (BOOP); enfermedad pulmonar intersticial asociada con bronquiolitis respiratoria (ILD); neumonía intersticial descamadora; t neumonía intersticial aguda (AIP).

Por "MCP-1" se entiende la secuencia de 76 aminoácidos en el acceso a registro de NCBI No. NP_002973 y variadamente conocida como MCP (proteína quimiotáctica de monocitos), SMC-CF (factor quimiotáctico de células de músculo liso), LDCF (factor quimiotáctico derivado de linfocitos), GDCF (factor quimiotáctico de monocitos derivado de glioma), TDCF (factores quimiotácticos derivados de tumor), HC11 (citosina humana 11), MCAF (factor quimiotáctico y activador de monocitos). El símbolo de gen es SCYA2, el gen JE en el cromosoma humano 17, y la nueva designación es CCL2 (Zlotnik,

Yoshie 2000. Immunity 12:121-127). JE es el homólogo de ratón de MCP-1/CCL2 humano.

Una molécula pequeña antagonista de MCP-1 se refiere a cualquier compuesto químico adecuado que inhibe la actividad de MCP-1 y se puede usar un terapéutico potencial. Dichos compuestos son conocidos en la técnica, tales como derivados de indol, derivados de amina cíclica, derivados de ureido, heterocíclicos, anilidas y pirroles funcionales con la capacidad para bloquear la unión de CCL2 a CCR2B, y/o inhibición de CCR1 o CCL2 mismo, como se describe en las publicaciones del PCT WO 9905279 (1999), WO 9916876 (1999), WO 9912968, WO 9934818, WO 9909178, WO 9907351, WO 9907678, WO 9940913, WO 9940914, WO 0046195, WO 0046196, WO 0046197, WO 0046198, WO 0046199, WO 9925686, WO 0069815, WO 0069432, WO 9932468, WO 9806703, WO 9904770, WO 99045791, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

Como se usa aquí, "tratamiento" usado en esta invención significa tratamientos que comprenden "controlar" y "revertir" las señales funcionales o histológicas de rechazo crónico.

Los mamíferos que pueden ser tratados en la presente invención incluyen mamíferos de ganado tales como vacas, caballos, etc., animales domésticos tales como perros, gatos, ratas, etc., y humanos, preferiblemente humanos.

Citas

Todas las publicaciones o patentes citadas aquí se incorporan aquí por referencia en su totalidad ya que muestran la técnica más avanzada en el tiempo de la presente invención y/o para proveer descripción y

5 habilitación de la presente invención. Las publicaciones se refieren a cualesquiera publicaciones científicas o de patentes, o cualquier otra información disponible en cualquier formato de medio, incluyendo todos los formatos grabados, electrónicos o impresos. Las siguientes referencias se incorporan aquí por referencia en su totalidad Ausubel, et al., ed., Current

10 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2006; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, 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

15 Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2006.)

Compuestos de la invención para neumonía intersticial usual (UIP) y fibrosis pulmonar idiopática

MCP-1 se sabe que se une y proporciona señal a través del

20 receptor de quimiocina CCR2. CCR2 es un receptor acoplado a proteína G con alcance de siete transmembrana expresado en muchas células incluyendo monocitos, células T, células B y basófilos. Los dos receptores específicos de MCP-1, CCR2A y CCR2B, han sido clonados los cuales

proporcionan señal en respuesta a concentraciones nanomolares (nM) de MCP-1. CCR2A (CC-CKR2A) y CCR2B (CC-CKR2A) representan dos ADNc que codifican dos receptores específicos de MCP-1 con colas de carboxilo alternativamente empalmadas. MCP-1 se une a ambas isoformas con alta
 5 afinidad. MCP-1 induce flujo de calcio en células que expresan CCR2B pero no en componente que expresan CCR2A. MCP-1 5 veces menor induce quimiotaxis de células que expresan CCR2B en comparación con células que expresan CCR2A.

Otras proteínas con cierta homología funcional y de secuencia a
 10 MCP-1 humano son conocidas. Especialmente similares a MCP-1 (GenBank NP_002973) son MCP-2 (GenBank NP_005614) y eotaxin (GenBank P_51671); MCP-2 que tiene 61.8 por ciento y eotaxin-1 que tienen 63.2 por ciento de identidad de secuencia a MCP-1. El intervalo de actividades y espectro de involucramiento de esas proteínas en mecanismos homeostáticos
 15 humanos y patología no es bien entendido para los homólogos de MCP-1. Por ejemplo, MCP-2 (renombrado CCL8) está estrechamente relacionado con MCP-1 y MCP-3 (renombrado CCL7, Genbank NP_006264) y usa CCR1 así como CCR2B como sus receptores funcionales. MCP-3 se une al receptor designado D6. MCP-3 también se une a CCR10 y CCR1. La secuencia de
 20 proteína de MCP-3 (97 aminoácidos) muestra 74 por ciento de identidad con MCP-1 y 58 por ciento de homología con MCP-2. MCP-3 secretado difiere de MCP-1 en que es N-glicosilado. MCP-4 (renombrado CCL13, Genbank NP_005399) comparte 56-61 por ciento de identidad de secuencia con las tres

proteínas quimiotácticas de monocitos conocidas y es 60 por ciento idéntica con Eotaxin-1. Las funciones de MCP-4 parecen ser altamente similares a las de MCP-3 y Eotaxin. Igual que MCP-3, MCP-4 es un quimioatrayente potente para monocitos y linfocitos T. Es inactiva sobre neutrófilos. En monocitos, MCP-4 se une a receptores que reconocen MCP-1, MCP-3, RANTES (CCL5), y eotaxin, los receptores de CCR1 y CCR3 y muestra desensibilización cruzada completa con eotaxin-1. MCP-5 es CC-quimiocina de murino y está más estrechamente relacionada con MCP-1 humana (66 % de identidad de aminoácidos). El símbolo de genes para MCP-5 es SCYA12 (renombrado CCL12). Las células transfectadas con el receptor de quimiocina CCR2 se ha mostrado que responden a MCP-5. información general sobre citocinas y quimiocinas está disponible en Internet de red mundial y para el sistema de clasificación actual, Zlotnik A., Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.

La discusión anterior sirve para hacer énfasis en que un antagonista puede impedir la función biológica de unión a CCR2 ya sea por acción directa sobre CCR2 o uno de sus ligandos, CCL2, CCL7, CCL8. En una modalidad de la invención, el antagonista se une a MCP-1/CCL2 y neutraliza su capacidad para unirse a CCR2.

Anticuerpos anti-CCR2 se describen en US6084075, US6458353 y US6696550. En una modalidad del método de la invención, un método para inhibir la interacción biológica de una célula que tiene CCR2 de mamífero con una quimiocina, comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad

efectiva de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que se une a CCR2 o una porción de dicho receptor. En una modalidad, el anticuerpo es anticuerpo monoclonal (mAb) LS132.1D9 (1D9) o un anticuerpo, que puede competir con 1D9 para unirse a CCR2 humano o una porción de CCR2 humana. También se contemplan fragmentos funcionales de los anticuerpos anteriores.

Anticuerpos capaces de unirse a MCP-1 se han reportado: JP9067399 describe un anticuerpo obtenido de células de sangre aisladas y JP05276986 describe un hibridoma que secreta MCP-1 antihumano de IgM. Más recientemente, anticuerpos capaces de unir una pluralidad de beta-quimiocinas incluyen MCP-1 se describieron (WO03048083) y un anticuerpo de unión a MCP-1 que también se une a eotaxin (US20040047860). Los anticuerpos que se unen selectivamente y neutralizan homólogos de ratón de MCP-1/CCL2 humano o MCP-1/CCL2 humano se describen en las solicitudes de patente copendientes de E.U.A. Series No. 11/170,453 y 60/682,654 cuyos contenidos y enseñanzas se incorporan aquí por referencia.

En una modalidad de la invención, el antagonista de CCR2 es un anticuerpo MCP-1/CCL2 antihumano designado C775 que puede ser producido por una línea celular designada C1142 como se describe en la solicitud de patente copendiente de E.U.A. Serie No. 11/170,453, variantes tales como formas humanizadas y reconfiguradas, formas truncadas, o fragmentos de unión de las mismas como se describe aquí. En otra modalidad, el antagonista de CCR2 es el anticuerpo MCP-1/CCL2 antihumano

designado variantes de CNT0888, formas truncadas o fragmentos de unión de los mismos como se define aquí y como se describe en las solicitudes de patente copendientes WO2006125202, cuyo contenido y enseñanzas se incorporan aquí por referencia.

5 En una modalidad, el anticuerpo MCP-1 que comprende regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera que comprende SEQ ID NOS: 27 y 28. El anticuerpo puede comprender por lo menos una región variable de cadena pesada y por lo menos una región variable de cadena ligera, dicho anticuerpo comprendiendo todas las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de cadena pesada y cadena
10 ligera (CDR) de SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14, y 16. El anticuerpo comprende por lo menos una región variable que comprende por lo menos una cadena pesada y por lo menos una cadena ligera, el anticuerpo MCP-1 comprendiendo tanto regiones variables de cadena pesada como de cadena
15 ligera que comprenden SEQ ID NOS: 27 y 28. El anticuerpo puede comprender por lo menos una región variable de cadena pesada y por lo menos una región variable de cadena ligera, dicho anticuerpo comprendiendo todas las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de cadena pesada y cadena ligera (CDR) de SEQ ID
20 NOS: 6, 7, 9, 13, 14, y 16. El anticuerpo puede comprender por lo menos una CDR de cadena pesada o cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14, y 16. El anticuerpo alternativamente puede comprender una región variable de cadena

pesada o cadena ligera de por lo menos una de SEQ ID NO: 2-5 que comprende además una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 6-26; y, opcionalmente
5 asociada funcionalmente con una región de marco de trabajo, opcionalmente comprendiendo además por lo menos CH1, gozne, CH2, o CH3 de una inmunoglobulina humana.

Truncaciones, variantes, proteínas mutantes o "muteínas" de MCP-1/CCL2 que tienen la capacidad para unirse a CCR2 y tienen actividad
10 antagonística también se pueden usar para poner en práctica el método de la invención. Variantes de quimiocinas formadoras de homodímero, tales como CCL2, que tienen una sola sustitución de aminoácidos en la interfaz de dimerización que altera el patrón de uniones de hidrógeno, para dar por resultado un monómero obligado que se une al receptor y tiene propiedades
15 agonísticas *in vitro* pero que pueden antagonizar quimiocinas naturales y tienen actividad antiinflamatoria *in vivo* como se enseña en WO05037305A1 están entre las variantes útiles en la práctica de la presente invención. Un antagonista de péptido de MCP 1, es el MCP-1(9- 76) truncado, que se mostró que previene el inicio de enfermedad y reduce síntomas de enfermedad en un
20 modelo de ratón de artritis (Jiang-Hong Gong, et al., J. Exp. Med. 1997, 186:131).

Modulación de expresión de CCR2/CCL2

Un método alternativo de antagonizar la interacción de CCR2 con sus ligandos, es eliminando el gen de expresión de CCR2 o sus ligandos, especialmente MCP-1/CCL2, usando, v.gr., métodos de silenciamiento de ARN. Por lo tanto, en otra modalidad, compuestos útiles para poner en práctica el método de la invención son ácidos nucleicos, incluyendo oligonucleótidos y polinucleótidos en orientación de sentido o antisentido, y moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla o doble cadena (v.gr., ARNic) que dirigen secuencias de MCP-1 e interfieren con la expresión del gen MCP-1 o que dirigen CCR2 interfieren con la expresión de gen de CCR2.

La expresión de genes puede ser modulada de varias maneras diferentes, incluyendo durante el uso de ARNic, ARNpc, moléculas de antisentido y ADNzimas, ARNic y ARNpc funcionan ambas mediante la vía de iARN y se han usado exitosamente para suprimir la expresión de genes. iARN se descubrió primero en gusanos y el fenómeno de silenciamiento de genes relacionado con ARNdc fue reportado por primera vez en plantas por Fire y Mello (Fire et al., 1998. Nature 391: 806) y se piensa que es una forma para que las células vegetales combatan infección con virus de ARN. En esta trayectoria, el producto viral de ARNdc largo es procesado en fragmentos más pequeñas de 21-25 pb de longitud por una enzima similar a un cortador y después la molécula de doble cadena es desenrollada y cargada en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Una trayectoria similar ha sido identificada en células de mamífero con la

notable diferencia de que las moléculas de ARNdc deben ser más pequeñas que 30 pb de longitud a fin de evitar la inducción de la llamada respuesta de interferón, que no es específica de gen y conduce a la interrupción global de la síntesis de proteína de célula.

5 ARNic sintéticos pueden ser diseñados para dirigir específicamente un gen y pueden ser fácilmente suministrados a células *in vitro* o *in vivo*. ARNpc son equivalentes de ADN de moléculas de ARNic y tienen la ventaja de ser incorporadas en el genoma de las células y después ser replicadas durante cada ciclo mitótico.

10 ADNzimas también se han usado para modular la expresión de genes. ADNzimas son moléculas de ADN catalíticas que digieren ARN de cadena sencilla. Son altamente selectivas para la secuencia de ARN objetivo y como tales pueden ser usadas para regular descendientemente genes específicos a través de la dirección de ARN mensajero.

15 La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento de genes post-transduccionales específicos de secuencia en animales mediados por ARN de interferencia cortos (ARNic) (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 &
20 Dev., 13:139-141; y Strauss, 1999, Science, 286, 886). La presencia de ARNdc en las células dispara la respuesta de iARN a través de un mecanismo que aún ha de ser caracterizado por completo. Este mecanismo parece ser diferente de otros mecanismos conocidos que involucran ribonucleasas

específicas de ARN de doble cadena, tales como la respuesta de interferón que resulta de activación mediada por ARNdc de PKR de proteína cinasa y 2',5'-oligoadenilato sintetasa que da por resultado digestión no específica de ARNm por ribonucleasa L (véase por ejemplo patentes de E.U.A. Nos. 5 6,107,094; 5,898,031; Clemens et al., 1997, J. Interferon & Cytokine Res., 17, 503-524; Adah et al., 2001, Curr. Med. Chem., 8, 1189).

La presencia de ARNdc largo en células estimulan la actividad de una enzima ribonucleasa III referida como un cortador (Bass, 2000, Cell, 101, 235; Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Hammond et al., 2000, 10 Nature, 404, 293). El cortador está implicado en el procesamiento de ARNdc en piezas pequeñas de ARNdc conocidas con ARN de interferencia corta (ARNic) (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Bass, 2000, Cell, 101, 235; Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363). Los ARN de interferencia corta derivados de la actividad de cortador son típicamente de aproximadamente 21 15 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y comprenden aproximadamente dúplex de 19 pares de bases (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188). El cortador también ha sido implicado en la escisión de ARN temporales pequeños de 21 y 22 nucleótidos (ARNtp) a partir del ARN precursor de estructura conservada que 20 están implicados en el control de traducción (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834). La respuesta de iARN también presenta un complejo de endonucleasa, comúnmente referido como un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la digestión del ARN de cadena sencilla

que tiene secuencia complementaria a la cadena de antisentido de dúplex de ARNic. La digestión del ARN objetivo tiene lugar a la mitad de la región complementaria a la cadena de antisentido del dúplex de ARNic (Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, 15, 188).

- 5 ARNic son ARN de doble cadena que incluyen la secuencia objetivo y su complemento. Dos residuos de uridina se añaden al extremo 3' de los ARN (Elbashir et al. 2001 *Nature* 411:494-498).

Interferencia de ARN (iARN) se usa ahora rutinariamente en células de mamífero para estudiar las consecuencias funcionales de reducir la
10 expresión de genes específicos. iARN es inducido al transfectar ARN de interferencia pequeña (ARNip), que comprende moléculas de ARN de doble cadena ~21 nt de longitud con residuos 2 nt 3' (Elbashir et al. 2001 *supra*), o moléculas de 45-50 meros (ARNpc) formadoras de pasador (Paddison, PJ, et al., 2002. *Genes & Development* 16:948-958), que son complementarias al
15 gen de interés. Cuando son transfectados a células de mamífero, los plásmidos de expresión de ARNip se ha mostrado que reducen el nivel tanto de productos de gen exógenos como endógenos. Aunque requieren más esfuerzo para preparar que los ARNip químicamente sintetizados o transcritos *in vivo*, los vectores de ARNic pueden proveer reducción a plazo más largo en
20 expresión de genes objetivos cuando se coexpresen con un marcador seleccionable (Brummelkamp, TR, et al., 2002. *Science* 296:550-553).

Antagonistas no de proteína, no de ácido oligonucleico

Fármacos de molécula pequeña y peptidomiméticos pueden ser antagonistas de CCR2. Por ejemplo, los documentos WO04069809, WO04069810, WO05118574, WO06015986 enseñan mercaptoimidazoles como antagonistas de receptor de CCR2. Otras moléculas pequeñas que presentan las propiedades biológicas deseadas se pueden seleccionar por determinación selectiva usando métodos tales como aquellos descritos aquí y tendrán la propiedad de prevenir rechazo crónico y supervivencia de injerto prolongada.

10

Métodos para hacer anticuerpos

Anticuerpos antagonistas de CCR2 de la presente invención pueden ser opcionalmente producidos por una variedad de técnicas, incluyendo técnica de hibridación de células somáticas estándar (método de hibridoma) de Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedero apropiado, tal como un hámster o mono macaco, es inmunizado como se describe aquí para inducir linfocitos que produzcan o que sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos entonces son fusionados con células de mieloma usando una gente de fusión adecuado tal como, polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press,

20

1986)).

El anticuerpo antagonístico de CCR2 también puede ser opcionalmente generado por inmunización de un animal transgénico (v.gr., ratón, rata, hámster, primate no humano y similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se describe aquí y/o como se conocen en la técnica. Células que producen, v.gr., un anticuerpo anti-MCP-1 humano se pueden aislar de dichos animales e inmortalizar usando métodos adecuados tales como los métodos descritos aquí.

El uso de ratones transgénicos que portan *loci* de inmunoglobulina humana (Ig) en su configuración de línea germinal proveen el asilamiento de anticuerpos monoclonales completamente humanos de alta afinidad dirigidos contra una variedad de objetivos incluyendo autoantígenos humanos para los cuales el sistema inmune humano normal es tolerante (Lonberg, N. et al., US5569825, US6300129 y 1994, Nature 368:856-9; Green, L. et al., 1994, Nature Genet. 7:13-21; Green, L. y Jakobovits, 1998, Exp. Med. 188:483-95; Lonberg, N y 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. y Taussig, M J., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458, 1997; Tomizuka et al. WO02043478). Los *loci* de inmunoglobulina endógena en dichos ratones pueden ser perturbados o deletados para eliminar la capacidad del animal

para producir anticuerpos codificados por genes endógenos. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) y Medarex (San Jose, Calif.) pueden ser contactadas para proveer anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología como se describió antes.

5 La preparación de antígenos inmunogénicos y la producción de anticuerpo monoclonal se pueden realizar usando cualquier técnica adecuada tal como producción de proteína recombinante. Los antígenos inmunogénicos se pueden administrar a un animal en forma de una proteína purificada, o mezclas de proteínas incluyendo células completas o extractos de células o
10 tejido, o el antígeno se puede formar de nuevo en el cuerpo del animal a partir de ácidos nucleicos que codifican el antígeno o una porción del mismo.

La inmunización con antígeno puede ser opcionalmente acompañada por la adición de un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund. La respuesta inmune puede ser monitoreada durante el curso del
15 protocolo de inmunización con muestras de plasma que son obtenidos por sangrados retroorbitales. El plasma puede ser determinado selectivamente por ELISA (como se describe más adelante), y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-MCP-1 se pueden usar para fusiones. Los ratones pueden ser reforzados intravenosamente por antígeno 3 días antes del
20 sacrificio y remoción del bazo. Se espera que 2-3 fusiones para cada antígeno puedan necesitar ser realizadas. Varios ratones serán inmunizados para cada antígeno.

Para generar hibridomas productores de anticuerpos

antagonistas de CCR2 monoclonales, esplenocitos y células de nodo linfático de ratones inmunizados se pueden aislar y fusionar a una línea de células inmortalizada apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser determinados selectivamente para la
5 producción de anticuerpos específicos de antígeno.

Una línea de células inmortal adecuada incapaz de producir cadenas de inmunoglobulina se selecciona de un progenitor de fusión, v.gr., una línea de células de mieloma tal como, pero sin limitarse a Sp2/0 y líneas de células derivadas, NS1 y derivados, especialmente líneas de NSO
10 manipuladas genéticamente tales como GS-NSO, AE-1, L.5, P3X63Ag8.653, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O o similares, o heteromielomas, productos de fusión de las mismas o cualquier célula o célula de fusión derivada de las mismas, o cualquier otra línea de
15 células adecuada como se conoce en la técnica (Birch et al. 1994. *Biologics* 22:127-133). Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y se pueden clonar por dilución limitante o distribución de células, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos
20 con la especificidad deseada se pueden seleccionar por una prueba adecuada (v.gr., ELISA) y seleccionar para manipulación.

Otros métodos adecuados para generar o aislar anticuerpos de la especificidad requerida se pueden usar, incluyendo, pero sin limitarse a,

métodos que seleccionan anticuerpo recombinante a partir de una genoteca de péptido o proteína (v.gr., pero sin limitarse a, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc o similares, genoteca de despliegue; v.gr., como está disponible de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, RU;

5 MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, RU; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Véase, v.gr., EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662;

10 PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); o péptidos o

15 proteínas estocásticamente generadas - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590689 (Ixsys, ahora Applied Molecular Evolution (AME), cada una incorporada aquí por referencia en su totalidad) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe aquí. Dichas técnicas

20 incluyen, pero no se limitan a despliegue de ribosomas (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (Mayo 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); tecnología productora de anticuerpos de células individuales (v.gr., método de anticuerpo de linfocitos

seleccionados ("SLAM") (patente de E.U.A. No. 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); microgotas de gel y citometría de flujo (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)); selección de células B (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, Holanda (1988)).

10 La determinación selectiva de anticuerpos para la unión específica a proteínas o fragmentos similares también se pueden lograr convenientemente usando genotecas de despliegue de péptidos. El método implica de determinación selectiva de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tienen la función o estructura deseada. La

15 determinación selectiva de anticuerpo usando genotecas de despliegue de péptidos es conocida en la técnica. Las secuencias de péptidos desplegadas pueden ser de 3 a 5000 o más aminoácidos de longitud, frecuentemente de 5-100 aminoácidos de longitud, y frecuentemente de aproximadamente 8 a 25 aminoácidos de longitud. Las genotecas de despliegue de péptidos, vector, y

20 equipos de determinación selectiva están comercialmente disponibles de proveedores tales como Invitrogen (Carlsbad, CA), y Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, RU). Véase, v.gr., patentes de E.U.A. Nos. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621,

5656730, 5763733, 5767260, 5856456, cedidas a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, cedidas a Dyax, 5427908, 5580717, cedidas a Affymax; 5885793, cedidas a Cambridge antibody Technologies; 5750373, cedidas a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, cedidas a Xoma, Colligan, supra; Ausubel, supra; o Sambrook, supra, cada una de las patentes y publicaciones anteriores incorporadas aquí por referencia en su totalidad.

Fragmentos de anticuerpo

10 Los fragmentos de anticuerpo se pueden derivar por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, v.gr., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidas directamente por células hospedero recombinantes. Los

15 fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab, Fv y ScFv pueden ser expresados todos ellos en y secretados de células hospedero de mamífero o de *E. coli*, permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de las genotecas del fago de anticuerpo descritas anteriormente. Alternativamente,

20 fragmentos de Fab'-SH pueden ser directamente recuperados de *E. coli* y químicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163- 167 (1992)).

En otras modalidades, el anticuerpo es un fragmento Fv de

cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; patente de E.U.A. No. 5,571,894; y patente de E.U.A. No. 5,587, 458. Fv y sFv son especies con sitios de combinación intactos, es decir, un dominio VH y VL, que están desprovistos de regiones constantes. Típicamente, los dominios VH y VL son

5 clonados y manipulados por ingeniería genética nuevamente para estar dentro de un polipéptido individual y conectados por un enlazador flexible suficientemente largo para permitir la interacción de dos dominios dentro del polipéptido individual. Alternativamente, se pueden construir proteínas de fusión para producir fusión de una proteína efectora ya sea en el amino

10 terminal o el carboxi terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, 1995. ed. Borrebaeck.

Métodos de identificación de antagonistas

Antagonistas de actividad biológica de CCR2 pueden ser

15 identificados usando pruebas *in vitro* adecuadas y modelos *in vivo* como se ilustra más adelante.

Las pruebas de inhibición de unión se pueden usar para identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos que unen CCR2 e inhiben la unión de otros compuesto tal como un ligando (v.gr., MCP-1, MCP-2, MCP-

20 3 y/o MCP-4) a CCR2 o una variante funcional. Por ejemplo, una prueba de unión se puede conducir en la cual una reducción en la unión de un ligando de CCR2 (en presencia de un anticuerpo), en comparación con la unión del ligando en ausencia del anticuerpo, es detectada o medida. Una composición

que comprende un CCR2 de mamífero aislado y/o recombinante o variante funcional del mismo se puede poner en contacto con el ligando y anticuerpo simultáneamente, o uno después del otro, en cualquier orden. Una reducción en el grado de unión del ligando en presencia del anticuerpo es indicativa de inhibición de unión por el anticuerpo. Por ejemplo, la unión del ligando podría ser disminuida o anulada.

En una modalidad, la inhibición directa de la unión de un ligando (v.gr., una quimiocina tal como MCP-1/CCL2) a un CCR2 de mamífero o variante del mismo por un anticuerpo o fragmento es monitoreada. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo para inhibir la unión de MCP-1 marcada con ^{125}I , MCP-2 marcada con ^{125}I , MCP-3 marcada con ^{125}I o MCP-4 marcada con ^{125}I a CCR2 de mamífero se puede monitorear. Dicha prueba se puede conducir usando células adecuadas que contienen CCR2 o una variante funcional del mismo, tal como células sanguíneas aisladas (v.gr., células T, PBMC) o una línea de células adecuada que expresa naturalmente CCR2, o una línea de células que contiene ácido nucleico que codifica CCR2 de un mamífero o una fracción de membrana de dicha célula, por ejemplo.

Otros métodos de identificación de la presencia de un anticuerpo que unen CCR2 están disponibles, tales como otras pruebas de unión adecuadas o métodos que monitorean eventos que son disparados por unión de receptor, incluyendo función de señalización y/o estimulación de una respuesta celular (v.gr., tránsito de leucocitos).

Se entenderá que el efecto inhibitorio de anticuerpos de la

presente invención se puede evaluar en una prueba de inhibición de unión. Competencia entre anticuerpos para unión a receptor se puede evaluar en el método. Anticuerpos que se identifican de esta manera pueden ser evaluados además para determinar si, después de la unión, actúan para inhibir otras
5 funciones de CCR2 y/o evalúan su utilidad terapéutica.

Pruebas de señalización

La unión de un ligando o promotor, tal como un agonista, a CCR2 puede dar por resultado la señalización por este receptor acoplado a
10 proteína G, y la actividad de proteínas G así como otras moléculas de señalización intracelular es estimulada. La inducción de la función de señalización por un compuesto (v.gr., un anticuerpo o fragmento del mismo) puede ser monitoreado usando cualquier método adecuado. Dicha prueba se puede usar para identificar agonistas de anticuerpo de CCR2. La actividad
15 inhibidora de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo u otros compuestos antagonista de CCR2 candidato se puede determinar usando un ligando o promotor en la prueba, y evaluar la capacidad del anticuerpo para inhibir la actividad inducida por ligando o promotor.

La actividad de proteína G, tal como hidrólisis de GTP a GDP, o
20 eventos de señalización posteriores disparados por unión a receptor, tal como inducción de incremento rápido y transitorio en la concentración de calcio libre intracelular (citósólico) $[Ca^{2+}]_i$, se puede evaluar por métodos conocidos en la técnica y otros métodos adecuados (véase v.gr., 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)).

Por ejemplo, la prueba funcional de Sledziewski et al. usando receptores acoplados a proteína G híbridos se pueden usar para monitorear la capacidad de un ligando o promotor para unirse a receptor y activar una proteína G (Sledziewski et al., patente de E.U.A. No. 5,284,746, cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia).

Dichas pruebas se pueden realizar en presencia del anticuerpo o fragmento del mismo que se ha de evaluar, y la capacidad del anticuerpo o fragmento para inhibir la actividad inducida por el ligando o promotor se determina usando métodos conocidos y/o método descritos aquí.

Quimiotaxis y prueba de estimulación celular

Las pruebas de quimiotaxis también se pueden usar para evaluar la capacidad de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo para actuar como un antagonista de CCR2. La actividad inhibidora de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo u otro compuesto antagonista de CCR2 candidato para bloquear la unión de un ligando a un CCR2 de mamífero o variante funcional del mismo e inhibir la quimiotaxis como una función asociada con la unión del ligando al receptor es útil a este respecto. Estas pruebas se basan en la migración funcional de células *in vitro* o *in vivo* inducida por un compuesto, en este caso ya sea CCL2 u otro ligando capaz de activar CCR2. La quimiotaxis puede ser evaluada, v.gr., en una prueba en

la que se utiliza una placa de quimiotaxis de 96 pozos, o usando otros métodos reconocidos en la técnica para evaluar quimiotaxis. Por ejemplo, el uso de una prueba de quimiotaxis transendotelial *in vitro* se describe en Springer et al. (Springer et al., WO 94/20142, publicada el 15 de septiembre de 1994, cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia; véase también Berman et al., Immunol. Invest. 17:625-677 (1988)). La migración a través del endotelio hacia los geles de colágeno también se han descrito (Kavanaugh et al., J. Immunol., 146:4149-4156 (1991)). Transfectantes estables de células L1-2-pre-B de ratón u otras células hospedero capaces de tener quimiotaxis se pueden usar, por ejemplo, en pruebas de quimiotaxis.

Generalmente, las pruebas de quimiotaxis monitorean el movimiento direccional o migración de una célula adecuada (tal como un leucocito (v.gr., linfocito, eosinófilo, basófilo)) hacia o a través de una barrera (v.gr., endotelio, un filtro), hacia niveles incrementados de un compuesto, desde una primera superficie de la barrera hacia una segunda superficie opuesta. Las membranas o filtros proveen barreras convenientes, de tal manera que el movimiento direccional o migración de una célula adecuada hacia o a través de un filtro, hacia niveles incrementados de un compuesto, desde una primera superficie del filtro hacia una segunda superficie opuesta del filtro, es monitoreada. En algunas pruebas, la membrana es revestida con una sustancia para facilitar la adhesión, tal como ICAM-1, fibronectina o colágeno. Muchas pruebas proveen una aproximación *in vitro* de "asentamiento" de leucocitos.

Por ejemplo, se puede detectar o medir la inhibición de la migración de células en un contenedor adecuado (un medio de contención), desde una primera cámara hacia o a través de una membrana microporosa hacia una segunda cámara que contiene un anticuerpo que ha de ser probado, y que es dividido de la primera cámara por la membrana. Se selecciona una membrana adecuada, que tiene un tamaño de poro adecuado para monitorear migración específica en respuesta al compuesto, incluyendo, por ejemplo, nitrocelulosa, policarbonato. Por ejemplo, se pueden usar tamaños de poro de aproximadamente 3-8 micras y preferiblemente de aproximadamente 5-8 micras. El tamaño de poro puede ser uniforme de un filtro o dentro de un intervalo de tamaños de poro adecuados.

Para evaluar la migración e inhibición de migración, la distancia de migración hacia el filtro, el número de células que cruzan el filtro que permanece adherente a la segunda superficie del filtro, y/o el número de células que se acumulan en la segunda cámara se pueden determinar usando técnicas estándares (v.gr., microscopia). En una modalidad, las células son marcadas con un marcador detectable (v.gr, radioisótopo, marcador fluorescente, antígeno o marcador de epítipo), y la migración se puede evaluar en presencia y ausencia del anticuerpo o fragmento determinando la presencia del marcador adherente a la membrana y/o presente en la segunda cámara usando un método apropiado (v.gr., detectando radioactividad, fluorescencia, inmunoensayo). El grado de migración inducido por un agonista de anticuerpo se puede determinar en relación con un control adecuado (vgr.,

comparado con migración de fondo determinada en ausencia del anticuerpo, comparada con el grado de migración inducido por un segundo compuesto (es decir, un estándar), comparado con migración de células no transfectadas inducidas por el anticuerpo).

5 En una modalidad, particularmente para células T, los monocitos o células que expresan un CCR2 de mamífero, migración endotelial puede ser monitoreada. En esta modalidad, la transmigración a través de una capa de células endoteliales es evaluada. Para preparar la capa de células, las células endoteliales pueden ser cultivadas sobre un filtro microporoso o membrana, 10 opcionalmente revestido con una sustancia tal como colágeno, fibronectina u otras proteínas de matriz extracelular, para facilitar la unión de células endoteliales. Preferiblemente, las células endoteliales se cultivan hasta que se forma una monocapa confluyente. Una variedad de células endoteliales de mamífero pueden estar disponibles para la formación de monocapa, 15 incluyendo por ejemplo endotelio de vena, arteria o microvascular, tal como células endoteliales de vena umbilical humana (Clonetics Corp, San Diego, California). Para probar quimiotaxis en respuesta a un receptor de mamífero particular, las células endoteliales del mismo mamífero son preferidas; sin embargo, también se pueden usar células endoteliales de una especie o 20 género de mamífero heterólogo.

Generalmente, la prueba se realiza detectando la migración direccional de células hacia o a través de una membrana o filtro, en una dirección hacia niveles incrementados de un compuesto, desde una primera

superficie del filtro hacia una segunda superficie opuesta del filtro, en donde el filtro contiene una capa de células endoteliales sobre una primera superficie la migración direccional ocurre desde el área adyacente hasta la primera superficie, hacia o a través de la membrana, hacia un compuesto situado
5 sobre el lado opuesto del filtro. La concentración de compuesto presente en el área adyacente a la segunda superficie es mayor que en el área adyacente a la primera superficie.

En una modalidad usada para probar un inhibidor de anticuerpo, una composición que comprende células capaces de migración y expresión de
10 un receptor de CCR2 de mamífero se pueden colocar en la primera cámara. Una composición que comprende uno o más ligandos o promotores capaces de inducir quimiotaxis de las células en la primera cámara (que tiene función quimioatrayente) se coloca en la segunda cámara. Preferiblemente poco antes de que las células se coloquen en la primera cámara o simultáneamente con
15 las células, una composición que comprende el anticuerpo que se ha de probar se coloca preferiblemente en la primera cámara. Anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que pueden unirse a receptor e inhibir la inducción de quimiotaxis, por un ligando o promotor, de las células que expresan CCR2 de mamífero en esta prueba son inhibidores de funciones de
20 receptor (v.gr., inhibidores de función estimuladora). Una reducción en el grado de migración inducido por el ligando o promotor en presencia del anticuerpo o fragmento es indicativa de actividad inhibidora. Estudios de unión separados (véase lo anterior) se podrían realizar para determinar si la

45

inhibición es un resultado de unión del anticuerpo a receptor u ocurre por medio de un mecanismo diferente.

Pruebas *in vivo* que monitorean infiltración de leucocitos de un tejido, en respuesta a inyección de un compuesto (v.gr., quimiocina o anticuerpo) en el tejido, son modelos de asentamiento *in vivo* y miden la capacidad de las células para responder a un ligando o promotor por migración y quimiotaxis a un sitio de inflamación y para evaluar la capacidad de un anticuerpo o fragmento del mismo para bloquear esta migración.

Además de los métodos descritos, los efectos de un anticuerpo o fragmento sobre la función estimuladora de CCR2 se pueden evaluar monitoreando las respuestas celulares inducidas por receptor activo, usando células hospedero adecuadas que contienen receptor.

Identificación de ligandos adicionales e inhibidores de función de CCR2 de mamífero

Las pruebas descritas anteriormente, que se pueden usar para evaluar unión y función de los anticuerpos y fragmentos de la presente invención, se pueden adaptar para identificar ligandos adicionales u otras sustancias que se unen a CCR2 de un mamífero o variante funcional del mismo, así como inhibidores y/o promotores de una función de CCR2 de mamífero. Por ejemplo, agentes que tienen la misma o similar especificidad de unión que la de un anticuerpo de la presente invención o porción funcional del mismo se pueden identificar mediante una prueba de competencia con dicho

anticuerpo o porción del mismo. Por lo tanto, la presente invención también abarca métodos de identificación de ligandos del receptor u otras sustancias que se unen a proteínas CCR2 de mamífero, así como inhibidores (v.gr., antagonistas) o promotores (v.gr., agonistas) de función receptora. En una
5 modalidad, las células que tienen una proteína CCR2 de mamífero o variante funcional de la misma (v.gr., leucocitos, líneas celulares o células hospedero adecuadas que han sido genéticamente manipuladas para expresar una proteína CCR2 de mamífero o variante funcional codificada por un ácido nucleico introducido en dichas células) se usan en una prueba para identificar
10 y evaluar la eficacia de ligandos u otras sustancias que se unen a receptor, incluyendo inhibidores o promotores de función de receptor. Muchas células también son útiles en la evaluación de la función de la proteína o polipéptido receptor expresado.

De conformidad con la presente invención, ligandos y otras
15 sustancias que se unen al receptor, inhibidores y promotores de función de receptor pueden ser identificadas en una prueba adecuada, y posteriormente evaluadas para efecto terapéutico. Los inhibidores de la función de receptor se pueden usar para inhibir (reducir o prevenir) actividad del receptor, y ligandos y/o promotores se pueden usar para inducir (disparar o incrementar)
20 función receptora normal en donde se indica. Por lo tanto, la presente invención provee un método de tratamiento de rechazo de injerto, que comprende administrar un inhibidor de función de receptor a un individuo (v.gr., un mamífero).

Composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de CCR2

La invención incluye métodos para preparar composiciones farmacéuticas para modular la transcripción, expresión o actividad de un CCR2. Dichos métodos comprenden formular un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o actividad de un CCR2. Dichas composiciones además pueden incluir agentes activos adicionales. Por lo tanto, la invención además incluye métodos para preparar una composición farmacéutica al formular un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o actividad de un CCR2 y uno o más compuestos activos adicionales.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente adecuados que son no tóxicos para la célula o mamífero que es expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones utilizadas. Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución reguladora de pH acuosa. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen reguladores de pH tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, histidina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, dextrinas; agentes quelatadores

tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG), PLURONICS® y ácido hialurónico (HA).

- 5 Las formulaciones pueden ser diseñadas para optimizar estabilidad del antagonista de CCR2 o además, permiten la liberación sostenida o prolongada del activo en el torrente sanguíneo. Formulaciones adecuadas para cada tipo de antagonista de CCR2 y vía de administración se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of
10 Pharmacy", A. Gennaro, ed., 20ª edición, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000.

- Para que las formulaciones se puedan usar para administración *in vivo*, deben ser estériles. La formulación puede hacerse estéril por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de liofilización
15 y reconstitución. Las composiciones terapéuticas en la presente generalmente se colocan en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o frasco que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la
20 técnica.

Métodos de tratamiento

El método de la invención para tratamiento de fibrosis en un

sujeto incluye fibrosis específica de órganos o fibrosis sistémica. La fibrosis específica de órganos puede estar asociada con por lo menos una de fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis vascular, fibrosis de la piel, fibrosis ocular, fibrosis de médula ósea u otras fibrosis. La

5 fibrosis pulmonar puede estar asociada con por lo menos una de fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por fármacos, asma, sarcoidosis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La fibrosis hepática puede estar asociada con por lo menos una de cirrosis, esquistosomiasis o colangitis. La cirrosis se puede seleccionar de cirrosis alcohólica, cirrosis post-

10 hepatitis C, cirrosis biliar primaria. La colangitis es colangitis esclerosante. La fibrosis renal puede estar asociada con por lo menos una de nefropatía diabética o glomeruloesclerosis de lupus. La fibrosis cardíaca puede estar asociada con por lo menos un tipo de infarto de miocardio. La fibrosis vascular puede estar asociada con por lo menos una de restenosis arterial post-

15 angioplastia o aterosclerosis. La fibrosis de la piel puede estar asociada con por lo menos una de cicatrización de quemaduras, cicatrización hipertrófica, queloides o dermatopatía fibrosante nefrogénica. La fibrosis ocular puede estar asociada con por lo menos una de fibrosis retro-orbital, cirugía post-cataratas o vitreorretinopatía proliferativa. La fibrosis de médula ósea puede estar

20 asociada con por lo menos una de mielofibrosis idiopática o mielofibrosis inducida por fármacos. La otra fibrosis se puede seleccionar de enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren o dermatomiositis. La fibrosis sistémica se puede seleccionar de esclerosis sistémica y enfermedad de injerto versus

hospedero.

Evaluación del Paciente

La enfermedad pulmonar intersticial (ILD) abarca una gama
 5 diversa de trastornos fibróticos que son agrupados entre sí debido a manifestaciones clínicas, radiológicas, fisiológicas o patológicas similares. Un término más correcto, enfermedades pulmonares de parénquima difusas, es menos engañoso que la mayoría de los aquellos trastornos que afectan bronquiolos terminales, intersticios y alvéolos.

10 Aunque IPF se denomina una “neumonía”, la inflamación parece jugar un papel relativamente menor. Se piensa que factores ambientales, genéticos u otros factores desconocidos inicialmente disparan lesión de células epiteliales alveolares, pero se piensa que la proliferación de fibroblastos intersticiales y de células mesenquimatosas auto-perpetuantes y
 15 aberrantes (con deposición de colágeno y fibrosis) explica el desarrollo de enfermedad clínica. Los hallazgos histológicos clave son fibrosis subpleural con sitios de proliferación de fibroblastos (focos de fibroblastos) y cicatrización densa, alternando con áreas de tejido pulmonar normal (heterogeneidad). La inflamación intersticial diseminada ocurre con linfocitos, células plasmáticas e
 20 infiltración de histiocitos. La dilatación cística de alvéolos periféricos (en forma de panal) se encuentra en todos los pacientes e incrementa con enfermedad avanzada. Véase Merck Manual of Diagnosis and Therapy (18a ed.), Sección: Trastornos idiopáticos, Tema: Enfermedades pulmonares intersticiales,

Tópico: Neumonías intersticiales idiopáticas. 2006.

Enfermedades pulmonares difusas tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica e hipertensión pulmonar son excluidas de la clasificación de ILD. Pacientes con ILD avanzada padecen disnea profunda y finalmente sucumben a insuficiencia respiratoria. La enfermedad pulmonar intersticial incluye un grupo heterogéneo de trastornos que conducen a insuficiencia respiratoria y muerte en un número significativo de pacientes. El trasplante de pulmón es una opción terapéutica en candidatos selectos. La incidencia y predominancia exactas de ILD en la población general siguen siendo desconocidas. Se cree que ILD es más predominante que lo reportado anteriormente (5 casos por población de 100,000). Un estudio basado en poblaciones de Bernalillo County, New Mexico, reportó una predominancia de 80.9 casos por 100,000 en hombres y 67.2 casos por 100,000 en mujeres. La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es la forma más común de ILD que constituye hasta aproximadamente 45% de todos los casos en este estudio. Otras enfermedades pulmonares difusas que pueden dar por resultado insuficiencia respiratoria incluyen sarcoidosis, linfangioleiomiomatosis, histiocitosis de células de Langerhan o granuloma eosinofílico, neumonitis intersticial descamadora (DIP), neumonitis intersticial no específica (NSIP) y fibrosis pulmonar asociada con enfermedad de tejido conectivo.

La evaluación de un paciente con fibrosis pulmonar idiopática intersticial (paciente UIP/IPF o NSIP) para la necesidad de terapia anti-CCR2 se puede realizar en cualquier tiempo antes, durante o después de la

presentación sintomática de enfermedad usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, los métodos usados para diagnosticar enfermedad pulmonar incluyen severidad, v.gr., necesidad de ventilación mecánica, síntomas v.gr., tos, disnea, fiebre, hemoptisis; el tipo de inicio, gradual, agudo o subagudo, enfermedad subyacente, inmunodeficiencia, enfermedad vascular de colágeno, vasculitis; exposición ambiental, asbestos, antígenos de aves, emanaciones tóxicas, historia de ubicación, corticoesteroides, agentes citotóxicos, antibióticos, anormalidades de laboratorio, anemia, conteos de eosinófilos de suero elevados, anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos, precipitinas del suero contra *Aspergillus*, factor reumatoide; hallazgos radiográficos, opacitis normal, difusa o localizada, consolidación nodular o en parche, espacio aéreo o intersticial, predominancia del lóbulo superior o inferior; y efusión pleural descubrible por radiografía (HRCT), capacidades de vidrio triturado, bronquioectasis, evidencia de enfermedad de vías aéreas, lóbulo inferior, subpleural, microcística o quistes y nódulos del lóbulo superior bilateral, cambio de forma de panal, cambios císticos difusos bilateralmente. Finalmente, el paciente es sometido a pruebas de función pulmonar a fin de determinar si la patofisiología es obstructiva, restrictiva, obstructiva o restrictiva combinada, o normal.

20 Hallazgos histológicos en pacientes con IPF (UIP) incluyen opacidades lineales irregulares (patrón reticular). Sin embargo, esta observación puede ocurrir en enfermedad vascular de colágeno, asbestosis y neumonitis por hipersensibilidad crónica. Parénquima pulmonar distal tendrá

fibrosis con patrón de forma de panal en UIP. Otras formas de fibrosis intersticiales pueden ocurrir como resultado de: neumonía intersticial linfocítica, enfermedad vascular de colágeno, reacciones de fármacos, neumoconiosis (asbestosis, beriliosis, silicosis, neumoconiosis de metales duros, otras), sarcoidosis, histiocitosis de células de Langerhans (granuloma eosinofílico), infecciones granulomatosas crónicas, aspiración crónica, neumonitis de hipersensibilidad crónica, neumonía eosinofílica crónica organizada, daño alveolar difuso organizado y organizante, edema pulmonar intersticial crónico/congestión pasiva, radiación (crónica), neumonías infecciosas con cicatriz. El patrón de HRCT típico de UIP incluye reticulación periférica bibasilar con bronquiectasis en forma de panal y de tracción. La opacificación de vidrio molido no es característica de la enfermedad, y si está presente, usualmente es muy pequeña, algo de la cual actualmente se debe deber a fibrosis. Dos características que se ha mostrado que son más características para IPF son la forma de panal del lóbulo inferior, que tiene una relación de disparidad de 5.36 para diagnóstico de IPF y las denominadas "líneas irregulares del lóbulo superior" con una relación de disparidad de 6.28 para IPF (Hunninghake 2003. Chest. 124:1215-1223).

Los miofibroblastos están relativamente ausentes de tejido no fibrótico. Los miofibroblastos contienen fibras de actina de músculo liso que dan a estas células un fenotipo contráctil, que sirve para cerrar heridas. La actina de músculo liso alfa (α SMA) es un marcador para miofibroblastos. TGF β 1 es un factor de crecimiento fibrótico prototípico que previamente se ha

mostrado que induce expresión de α SMA (Desmouliere et al., 1995 Exp Nephrol 3(2):134-9). Usando fibroblastos cultivados de pacientes con UIP y fibroblastos de pulmones no fibróticos, los solicitantes han descubierto que TGF β 1 induce α SMA tanto en fibroblastos no fibróticos como fibróticos, sin embargo, la magnitud de inducción es mayor en fibroblastos fibróticos. La estimulación de los fibroblastos con PDGF induce un incremento moderado (menor que 10 veces) en una expresión de α SMA, pero sólo en los fibroblastos fibróticos. Entre estos tres, los datos de los solicitantes mostraron que sólo CCL2 indujo un incremento en expresión de α SMA en fibroblastos fibróticos por más de 10 veces.

La deposición de colágeno es un sello clave para fibrosis y dos genes, procolágeno I y procolágeno III, se ha mostrado anteriormente que están asociados con UIP. Las proteínas de procolágeno I y III se ha mostrado que se elevan en muestras de UIP, tanto en el pulmón como sistémicamente (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). Los solicitantes han demostrado que CCL2 induce procolágeno I y procolágeno III en fibroblastos de UIP. Además, la magnitud de inducción de gen por CCL2 es comparable con el producido por ambas citocinas profibróticas TGF β 1 y PDGF-AB.

El papel profibrótico de TGF β 1 se ha descrito bien en una variedad de tejidos y órganos. Los efectos de TGF β 1 son además amplificados a través de un mecanismo autócrino. Los solicitantes observaron

que este mecanismo de amplificación tanto en fibroblastos pulmonares no fibróticos como fibróticos estimulados con TGF β 1 en tanto que ambos tipos de células presentaron TGF β 1 incrementado en presencia de TGF β 1. CCL2 también se encontró que incrementa la expresión de TGF β 1 y, como con TGF β 1, el grado de inducción de gen de TGF β 1 por CCL2 fue mayor en fibroblastos fibróticos. Se ha encontrado anteriormente que los receptores de TGF β se elevan en fibroblastos dérmicos de pacientes con escleroderma (Kubo et al. 2002 J Rheumatol 29(12):2558-64, Kawakami 1998. J. Invest Dermatol 110(1):47-51). Aunque los fibroblastos UIP incubados con TGF β 1, PDGF y CCL2 había incrementado tanto en subunidades de receptor de TGF β sobre las de los fibroblastos no fibróticos, TGF β 1 Principalmente incrementó TGF β RI, y CCL2 indujo ambas subunidades que indican que el efecto no se puede deber sólo inducción de TGF β 1 por CCL2.

Se ha mostrado que el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es mediador de muchos de los efectos de TGF β 1 incluyendo producción de colágeno. TGF β 1 indujo un incremento en la expresión de gen de CTGF tanto en fibroblastos fibróticos como no fibróticos. Además, PDGF y CCL2 indujeron un incremento en expresión de gen CTGF en fibroblastos de UIP.

Los datos de los solicitantes mostraron que TGF β 1, PDGF y CCL2 elevaron la expresión de IL13Ra1 en fibroblastos de UIP. IL-13 es una citosina de tipo Th2 que se encuentra a niveles elevados en los pulmones de

pacientes con UIP. IL-13 es profibrótico en modelos *in vitro* e *in vivo*. IL-13 induce generación de colágeno y proliferación de fibroblastos (Saito 2003. Int Arch Allergy Immunol 2003;132(2):168-76, Ingram 2004 Faseb J 18(10):1132-4). Una variedad de datos de modelos de fibrosis pulmonar de murino indica
 5 que IL13 y señalización a través de IL13Ra2 es profibrótico y también puede actuar a través de inducción de TGF β 1 (Fichtner-Feigl 2006. Nat Med 12(1):99-106). Por lo tanto, los datos de los solicitantes mostraron que TGF β 1, PDGF-AB y CCL2 regulados ascendentemente todos ellos en expresión de IL13Ra2, indica que CCL2 puede directamente o indirectamente hacer a los
 10 fibroblastos más sensibles a respuestas mediadas por IL-13.

En general, los solicitantes han demostrado por primera vez, los sellos distintivos de respuesta profibrótica por fibroblastos de UIP a CCL2 y distinguieron la respuesta de fibroblastos de UIP de las de los pulmones no fibróticos. Estudios previos han indicado que CCR2 se expresa sobre células
 15 similares a miofibroblastos en la piel de pacientes con escleroderma (Carulli 2005 Arthritis Rheum 52(12):3772-82) y modelos animales de fibrosis pulmonar han mostrado una regulación ascendente de CCR2 sobre fibroblastos aislados de un ambiente de tipo Th2 fibrótico e incrementaron la funcionalidad de estas células a ligandos de CCR2 (Hogaboam 1999. J
 20 Immunol 1999, 163(4):2193-201). Sin embargo, éste es el primer estudio conocido que indica un papel funcional profibrótico para CCL2 sobre fibroblastos de pulmón enfermo.

Se ha mostrado que la inhibición de CCR2-CCL2 es benéfica en

modelos *in vivo* de fibrosis. Mecanísticamente, la inhibición de fibrosis en modelos animales se ha atribuido a reclutamiento de fibrositos reducido e inflamación atenuada, que puede o no traducirse a enfermedad humana. La presente invención se basa en el uso por los solicitantes de fibroblastos humanos para demostrar que el ligando de CCR2 CCL2 puede impulsar respuestas profibróticas y los fibroblastos de UIP son de hiper-respuesta a CCL2. Por lo tanto, los datos indican que un método de bloqueo, inhibición, regulación descendente o antagonismo de bioactividad de CCR2, especialmente por el antagonismo de CCL2 a CCR2 será efectivo para mitigar el daño rápido y actualmente irreversible a tejido pulmonar intersticial que da por resultado la pérdida de función pulmonar ya que los solicitantes han establecido un efecto profibrótico directo de CCL2 sobre fibroblastos pulmonares humanos enfermos.

En los métodos de la invención, un antagonista de CCR2 se puede administrar en el tiempo de inicio de UIP de marcadores detectables como se describe aquí, incluyendo pero sin limitarse a CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF.

El conocimiento actual en el campo relacionado con diagnóstico y manejo de IID, particularmente IPF, indica que las causas y eventos de inicio que conducen a fibrosis son variados como lo es la patología celular (Chapman 2004 J Clin Invest 113(2): 148-157). Para determinar qué subconjunto de pacientes diagnosticados podrían ser ayudados por terapia anti-CCL2, la identificación de biomarcadores asociados con enfermedad

mediada por CCL2 sería valiosa. Estudios de tejido de IPF han revelado regulación diferencial de una regulación ascendente de MMP-7 al nivel de expresión de gen y varias proteínas se ha mostrado que son reguladas ascendentemente en fluido de lavado bronquial y/o suero incluyendo KL-6, ENA-78, IP-10, CCL7, IL-2, IL-8, IL-10 e IL-12 (p40). Sin embargo, hasta la fecha no ha habido correlación entre las proteínas y atenuación de CCL2. Varias citocinas además de CCL2, tales como IL-1, PDGF, Osteopontina, TNF, TGF, CCL3, CXCL8, CXCL5, CXCL12, CXCL9, CXCL10, CXCL11, han mostrado que están implicadas en la patogénesis de IPF. Sin embargo, la relación con CCL2 sigue siendo poco clara y el análisis de expresión de gen de fibroblastos de pacientes con IPF hasta ahora ha producido diferentes resultados de diferentes laboratorios (Ver Studer et al., 2007. Proc Amer Thoracic Soc. 4(1): p. 85-9 para una visión general).

Los fibroblastos cultivados tienen niveles basales detectables de CCL2 y CCL2 exógenamente añadido recientemente ha mostrado que modula la producción de IL-6 (Liu, X., et al 207 Amer J Respir Cell Molec Biol. 37(1):121-8). Por lo tanto, CCL2 se comporta como un mediador central y neutralización de CCL2 en el ambiente de los fibroblastos de IPF modulará la expresión de otros genes y/o proteínas.

Los solicitantes han determinado, usando fibroblastos residentes aislados de pacientes fibróticos, que fibroblastos pulmonares de pacientes con IPF expresaron niveles más altos de CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF que los fibroblastos no fibróticos. Los solicitantes también han

determinado que CNTO 888, un anticuerpo de CCL2 neutralizante, fue capaz de bloquear la producción de estas proteínas en células que expresan los niveles más altos.

Un diagnóstico preciso de IPF implica biopsia de tejido pulmonar y análisis histológico para neumonía intersticial poco usual. Debido a la capacidad de invasión de este procedimiento, no sería práctico monitorear la progresión de enfermedad rutinariamente después del diagnóstico inicial. Otros diagnósticos no invasivos están disponibles pero están sujetos a variabilidad. Por lo tanto, es necesaria una herramienta de diagnóstico cuantitativa no invasiva. Fluidos de tejido tales como suero o fluido de lavado broncoalveolar se pueden muestrear de manera menos invasiva que las biopsias quirúrgicas. Proteínas solubles y marcadores de superficie celular o expresión de genes de células recolectadas podrían ser cuantificados todos ellos con tecnologías existentes para diagnosticar y monitorear la progresión de la enfermedad. El monitoreo de tejido para estos genes y/o proteína se podrían usar para determinar el contenido de neutralización de CCL2 por CNTO 888. Por lo tanto, la determinación de gen y/o proteína para CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF a partir de tejido periférico accesible proveerá un biomarcador novedoso y relativamente no invasivo de enfermedad y neutralización objetivo.

En una modalidad para evaluar a un paciente, 5 o más ml de sangre del paciente se pueden extraer en tubos diseñados para análisis de ácido nucleico tales como tubos de ARN de sangre PAXgen

(SystemPreAnalytiX) y el ARN se puede aislar y analizar para expresión de gen por cualquier método conocido en la técnica que incluya las sondas específicas para por lo menos uno de CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF. Los pacientes se pueden seleccionar para terapia en cualquiera
5 o todos los genes que tienen niveles de expresión mayor que 2 veces de los especímenes igualados en cuanto a edad y género de pacientes o sujetos normales que no despliegan síntomas de pacientes con una neumonía intersticial idiopática. En otra modalidad, la selección de dosis para pacientes seleccionados para terapia se puede ajustar con base en cambios de
10 expresión de dos veces o más en cualquiera o todos los genes comparados de voluntarios normales igualados en cuanto a edad y género. En otra modalidad del método de la invención, la respuesta a la terapia puede ser monitoreada con base en cambios de expresión de dos veces o más en cualquiera o todos los genes comparados con voluntarios normales igualados
15 en cuanto a edad y género.

En otra modalidad, 5 ml de sangre pueden ser recolectados de pacientes que despliegan síntomas de neumonía intersticial idiopática en tubos de recolección de suero. El suero se puede probar para cualquiera de CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF usando múltiplex
20 comercialmente disponibles o equipos de ELISA. Los pacientes se pueden seleccionar para terapia si cualquiera o todas las proteínas tienen niveles de expresión mayores que dos veces los de los voluntarios normales igualados en cuanto a edad y género. En otro aspecto, la selección de dosis para

61

pacientes seleccionados para terapia se puede ajustar con base en cambios de expresión de dos veces o más en cualquiera o todos de CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF en comparación con voluntarios normales igualados en cuanto a edad y género. En un aspecto adicional, la
 5 respuesta a la terapia puede ser monitoreada con base en cambios de expresión de dos veces o más en cualquiera o todos de CXCL5, IL-6, CCL2, IL13RA2, VEGF, IL-8 y G-CSF en comparación con voluntarios normales igualados en cuanto a edad y género.

10

Vías de administración

La vía de administración es de conformidad con métodos conocidos y aceptados, v.gr., inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, mediante la vena portal; administración tópica, por liberación sostenida o medios de liberación
 15 prolongada; inyección subcutánea, por suministro transmucosa o transdérmico, a través de aplicaciones tópicas, aspersión nasal, supositorios y similares, o puede ser administrada por vía oral.

En otro aspecto del método, la administración puede ser por lo menos por un modo seleccionado de administración parenteral, subcutánea,
 20 intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal,

intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

5

Dosis

La dosis de antagonista anti-CCR2 que es apropiada para prevenir, mitigar, revertir o detener la progresión de rechazo crónico en un paciente que necesita el mismo se encontrará empíricamente y dependerá de la potencia del agente activo, la resistencia de la formulación y la duración del nivel efectivo del agente después de la administración en el cuerpo del receptor.

El curso de tratamiento puede ser administración crónica o continua en un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo prolongado. Alternativamente, el tratamiento puede ser intermitente o cíclico en naturaleza a fin de proveer periodos de actividad antagonista aguda, seguido por periodos de actividad inferior o no antagonista en el cuerpo del paciente. Por lo tanto, el programa de dosis puede ser variado, de tal manera que el anticuerpo se administra una vez, dos veces, tres o más veces por semana para cualquier número de semanas o el anticuerpo se administra más de una vez (v.gr., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete veces) con administración que ocurre una vez a la semana, una vez cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez semanas.

En el caso de antagonista de anticuerpo monoclonal de bioactividad de CCR2, el agente generalmente se administrará en una cantidad que se basa en el peso corporal del receptor, v.gr., entre 0.1 y 100 mg/kg por curso de terapia. Un intervalo no limitante ilustrativo para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo administrado de conformidad con los métodos de la invención es 0.1-20 mg/kg, muy preferiblemente 1-10 mg/kg. En una modalidad, el anticuerpo anti-CCR2 o anti-CCL2 se puede administrar por infusión intravenosa a una velocidad de menos de 10 mg/min, preferiblemente menos de o igual a 5 mg/min para alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 500 mg/m², preferiblemente aproximadamente 10 a 400 mg/m², aproximadamente 18 a 350 mg/m², y muy preferiblemente aproximadamente 250-280 mg/m². El anticuerpo anti-CCR2 o anti-CCL2 se puede administrar en una sola dosis o en dosis múltiples.

15

Terapia de Combinación

Tratamiento

Ningún tratamiento específico ha probado ser efectivo para IPF. La terapia de soporte consiste de O₂ para hipoxemia y antibióticos para neumonías. La enfermedad de etapa terminal puede calificar a pacientes seleccionados para trasplante de pulmón. Corticoesteroides y fármacos citotóxicos tales como ciclofosfamida (CYTOXAN), azatioprina (IMURAN) se han dado tradicionalmente a pacientes con IPF empíricamente en un intento

para detener la progresión de inflamación, pero datos limitados soportan su eficacia. Sin embargo, es práctica común intentar el tratamiento con prednisona (v.gr., DELTASONA) (0.5 a 1.0 mg/kg por una vez/día durante 3 meses, hasta 0.25 mg/kg una vez/día durante los siguientes 3 a 6 meses) combinada con ciclofosfamida o azatioprina (1 a 2 mg/kg po una vez/día). Cada 3 meses durante 1 año, las respuestas clínicas, radiográficas y fisiológicas son evaluadas, y la dosis del fármaco se incrementa o disminuye de acuerdo con ello. La terapia se detiene si no hay respuesta objetiva.

La pirfenidona, un agente antifibrótico, puede estabilizar la función pulmonar y reducir exacerbaciones. Antifibróticos que inhiben síntesis de colágeno (relaxin), factores de crecimiento profibróticos (suramin) y endotelina-1 (un bloqueador de receptor de angiotensina) sólo han demostrado ser efectivos *in Vitro*.

El interferón- γ -1b ha mostrado ser prometedor cuando se combina con prednisona en un grupo de pacientes, pero un ensayo de distribución aleatoria multinacional de doble ciego no encontró efecto sobre tiempo de supervivencia libre de progresión, función pulmonar o calidad de vida.

Aunque se ha descrito la invención en términos generales, las modalidades de la invención se describirán ahora en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Fibroblastos fibróticos y no fibróticos

A fin de caracterizar las propiedades inherentes de los
5 fibroblastos de pacientes con UIP en comparación con aquellos de tejido
pulmonar histopatológicamente no fibrótico, los fibroblastos primarios de uno o
el otro tipo de tejido son evaluados para marcadores en el estado no
estimulado y en respuesta a mediadores conocidos de patología fibrótica,
v.gr., TGFbeta, PDGF-AB, and CCL2.

10

Aislamiento y purificación de fibroblastos

Líneas de células fueron provistas por Dr Cory Hogaboam en la
Universidad de Michigan. Todas las líneas de fibroblastos primarias se
aislaron como se describió anteriormente (Hogaboam et al. 1999 J Immunol
15 163(4):2193-201). Los fibroblastos pulmonares se aislaron de biopsias de
pulmón tomadas de pacientes con UIP (n=4) y esas se refieren como
"fibroblastos fibróticos". Los fibroblastos también se aislaron de tejido
pulmonar tomado durante la extirpación de tumor de pulmón (n=5) y se
confirmó que esas muestras eran no fibróticas por análisis histológico. Estos
20 fibroblastos derivados de tejido no fibrótico se refieren como "fibroblastos no
fibróticos".

Expresión de gen de fibroblasto

Los fibroblastos de pulmón humano se colocaron en placas de 24 pozos (Costar, Corning, NY) a 100,000 células/pozo y se dejaron adherir durante 8 horas. Las células después se lavaron con PBS y se cultivaron durante la noche en medio libre de suero (DMEM con l-Glutamina, Pen/estrep). Las células después fueron estimuladas 24 hr en presencia o ausencia de TGFb-1 (1 ó 10 ng/ml), PDGF-AB (20 ó 200 ng/ml) o CCL2 (1 ó 10ng/ml). TGFb1, PDGF-AB y CCL2 se compraron de R&D Systems. Los sobrenadantes se removieron y el ARN se aisló subsecuentemente usando RNeasy Plus Mini-Kits (QIAGEN, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante y el ARN se sometió a transcripción reversa en ADNc usando reactivos de transcripción reversa TaqManâ (Applied Biosystems, Foster City, CA). La expresión de gen profibrótico se determinó por PCR de tiempo real usando la mezcla maestra de PCR universal Taqmanâ (Applied Biosystems) y pruebas de expresión de genes Taqmanâ predesarrolladas (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante.

La expresión de genes cuantitativa se calculó usando el método de CT comparativo, en donde los valores de CT se determinaron como el número de ciclo de umbral para el cual la expresión de genes es primero detectada. El número de veces de cambios en la expresión de genes para los genes de interés fueron primero normalizados para un gen de mantenimiento 18S, dando valores de CT. El número de veces de cambios en expresión entre fibroblastos fibróticos y no fibróticos se calculó como: $CT(\text{no fibrótico}) -$

CT(fibrótico) = CT, en donde la expresión de gen no fibrótico sirvió como el calibrador. El número de veces de cambios en la expresión de genes debido a estimulación *in vitro* se calcularon por $CT = CT(\text{no estimulado}) - CT(\text{estimulado})$, en donde la muestra no estimulada sirvió como el calibrador. El cálculo de 2^{-CT} entonces da un valor relativo para el número de veces de cambio final cuando se compara con el calibrador.

Para determinar si la expresión de línea basal en expresión de gen profibrótico fue diferente en fibroblastos de UIP (n=3) en comparación con fibroblastos no fibróticos (n=4), la expresión de gen se comparó entre las células no estimuladas de ambas cohortes de pacientes. Como se muestra en la figura 1, fibroblastos derivados de pacientes con UIP tienen mayor expresión de gen fibrótico de línea basal en todos los genes analizados.

TGFb1 indujo aSMA en fibroblastos no fibróticos y fibróticos, sin embargo, la magnitud de inducción fue mayor en fibroblastos fibróticos (figura 2). PDGF indujo un incremento moderado en expresión de aSMA y sólo en los fibroblastos fibróticos. CCL2 también indujo únicamente un incremento en expresión de aSMA en fibroblastos fibróticos.

Para determinar si el despliegue de fibroblastos de UIP incrementó los niveles de expresión de gen de colágeno, las células fueron estimuladas con CCL2. La figura 3A y B muestra que CCL2 induce tanto procolágeno I como procolágeno III en fibroblastos de UIP. Además, el grado de inducción de gen por CCL2 es comparable con aquel producido por TGFb1 y PDGF-AB.

El papel profibrótico de TGFb1 se ha descrito bien. TGFb1, PDGF y CCL2 indujeron expresión de gen de TGFb1 (figura 4). La inducción de TGFb1 por un bucle autócrino es conocido y es soportado por los presentes datos tanto con fibroblastos no fibróticos como fibróticos. Este experimento además demuestra que CCL2 también incrementa la expresión de gen de TGFb1. Igual que con TGFb1, el grado de inducción del gen de TGFb1 por CCL2 fue mayor en los fibroblastos fibróticos.

TGFb1, PDGF y CCL2 indujeron expresión de gen de CTGF (figura 5). TGFb1 indujo un incremento en expresión de gen de CTGF tanto en fibroblastos fibróticos como no fibróticos. Además, PDGF de dosis baja y CCL2 indujeron un incremento en la expresión de gen CTGF en fibroblastos de UIP.

La expresión de gen de subunidades TGFb1, PDGF y CCL2 inducidas por TGFbRI y TGFbRII se muestra en la figura 6A y B. TGFb1 tiene un efecto mayor sobre TGFbRI mientras CCL2 indujo ambos con un incremento un poco mayor en TGFbRII.

La expresión de gen IL13Ra1 y IL13Ra2 inducida por TGFb1, PDGF y CCL2 se muestra en la figura 7A y B. TGFb1, PDGF y CCL2 reguladas ascendentemente en expresión de IL13Ra1 en fibroblastos de UIP. La señalización a través de IL13Ra2 se ha demostrado recientemente que es profibrótica a través de inducción de TGFb1. Los tres mediadores indujeron una regulación ascendente en expresión de IL13Ra2, haciendo potencialmente a estas células más sensibles a respuesta mediada por IL-13.

EJEMPLO 2

Tejido pulmonar de pacientes con IPF y no fibróticos se trituró y se puso en un matraz de cultivo de tejido de T75cm con 20 ml de medio (DMEM con/15% de FCS, 1% de PSA, y L-Glutamina). El medio se cambió dos veces a la semana hasta que se formaron colonias de células. Las células fueron desprendidas y llevadas a pasaje. Los experimentos se realizaron después del pasaje número cinco.

10

Aislamiento de ARN

Los fibroblastos se cultivaron durante la noche en DMEM 15% de FCS 1% de Glutamax, 1% de penicilina/estreptomicina a 1×10^5 células en 500 ul/pozo de una placa de 24 pozos. Las células se cultivaron durante 24 hr en DMEM sin suero. El medio se cambió DMEM complementado con albúmina de suero humano y los cultivos se incubaron durante 24 y/o 48 hr. Para cosechar ARN, las componente cultivadas se lisaron usando un mini equipo RNeasy (Qiagen, Inc. Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de ARN se determinó con 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

20

RT-PCR

La reacción de transcripción reversa se realizó por protocolo usando reactivos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C

durante 10 minutos, 48°C durante 30 minutos, 95°C durante 5 minutos. Se realizó PCR en tiempo real usando disposiciones de baja densidad de ABI personalizadas (iniciadores y sondas de prueba sobre demanda duplicados) con el sistema de detección de secuencia ABI Prism® 7900. En presencia de

5 ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA), la reacción se incubó durante 2 min a 50°C seguido por 10 min a 95°C. Después la reacción se llevó a cabo durante 40 ciclos en 15 seg, 95°C y 1 min, 60°C por ciclo. El control endógeno GAPDH se uso para normalizar las muestras usando el método de DCT para cuantificación relativa.

10

Inmunodetección

Los fibroblastos se cultivaron durante la noche como se describió antes. Los sobrenadantes se pusieron en alícuotas para prueba usando panel 30plex de citocina/quimiocina humana LINCOplex (Millipore), equipo ENA-78

15 Quantikine y equipo IL-13RA2 ELISA (R&D systems)

Resultados:

ADNc de 7 líneas de fibroblastos pulmonares de IPF y 5 líneas de fibroblastos pulmonares no fibróticos se evaluaron a 24 hr por RT-PCR

20 para expresión relativa de CXCL5, CCL2, IL13ra2 y IL-6. El cuadro 1 muestra la expresión en número de veces relativa para cada línea de IPF sobre la media dCt (Ct – GAPDH Ct objetivo) para las líneas no fibróticas.

La línea de células de IPF 126 tuvo la mayor expresión para

CXCL5, IL13ra2 y IL-6. La expresión de CCL2 fue mayor que o igual a dos veces mayor que en las células no fibróticas para 6 de 7 líneas de células. Los niveles de expresión de CXCL5 y IL6 fueron mayores que o iguales a dos veces más que las células no fibróticas y para 5 líneas de células y la expresión de IL13ra2 fue mayor que o igual a dos veces más que las células no fibróticas para 4 líneas de células.

CUADRO 1

Línea No./ Gen	116	122	123	126	138	148	201	Mediana de número de veces de incremento
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

Análisis de proteína

Los sobrenadantes de 5 líneas de UIP y 5 líneas no fibróticas se probaron para expresión de proteína de IL-6, IL-8, CCL2, CXCL5, G-CSF y VEGF por ELISA o multiplex. Los cuadros 2 y 3 muestran los niveles de proteína en pg/ml para todas las líneas de células probadas. La línea de células fibrótica 148 tuvo los niveles de expresión más altos para IL-6, IL-8, G-CSF, CCL2, y VEGF. La línea de células 126 fue más alta para CXCL5 (16430 pg/ml). La expresión de IL-8 fue mayor que o igual a 2 veces la mediana de la

expresión no fibrótica para las 5 líneas de células. La expresión de CCL2 y IL-6 fue mayor que o igual a dos veces la mediana de la expresión no fibrótica para 4 de 5 líneas de células. La expresión de G-CSF fue mayor que o igual a dos veces la mediana de expresión no fibrótica para 2 líneas de células. La expresión de VEGF fue mayor que o igual a dos veces la mediana de expresión no fibrótica para 3 líneas de células. La expresión de CXCL5 fue mayor que o igual a dos veces la mediana de expresión no fibrótica (para valores por arriba de 0) para 2 líneas de células. La comparación de los valores de mediana para líneas de células fibróticas y no fibróticas indica que IL8 > IL6 ≥ CCL2 > VEGF en magnitud relativa de diferencia en la mediana entre las células fibróticas y no-fibróticas.

CUADRO 2

<u>Línea No./Proteína</u>	<u>130</u>	<u>131</u>	<u>134</u>	<u>135</u>	<u>139</u>	<u>Mediana</u>
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

CUADRO 3

<u>Línea No./ Proteína</u>	<u>116</u>	<u>117</u>	<u>123</u>	<u>126</u>	<u>148</u>	<u>Mediana</u>	<u>Fibrótico/ No Fibrótico</u>
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	-

A fin de examinar la relación entre estos mediadores, la línea de células fibrótica 126 se trató con anticuerpo CCL2-neutralizante CNTO888 que está compuesto de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera dadas por SEQ ID NO. 27 y 28, respectivamente, o un anticuerpo coincido por isotipo irrelevante y los niveles de expresión de gen y proteína comparados con la misma línea de células sin anticuerpo presente. Los resultados para la expresión genética se muestran en el cuadro 4 y para expresión de proteína en el cuadro 5.

CUADRO 4

<u>Gen</u>	<u>Por ciento de nivel de células no tratadas</u>	
	<u>Otra IgG1</u>	<u>Anti-CCL2</u>
CXCL5	59	<1
CCL2	106	2
IL13Ra2	82	5
IL6	98	<1

CUADRO 5

<u>Proteína</u>	<u>No tratadas</u>	<u>Otra IgG1</u>	<u>Anti-CCL2</u>	<u>Por ciento de no tratadas</u>	
				<u>Otra IgG1</u>	<u>Anti-CCL2</u>
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

CCL2 no se puede medir con precisión en presencia del anticuerpo anti-CCL2 (CNTO888), aunque la presencia de anti-CCL2 se puede monitorear durante la terapia. El número de veces más alto de reducción de proteína con CNTO 888 fue G-CSF (6803 veces). El número de veces más bajo fue con VEGF (4 veces): G-CSF > IL6 = CXCL5 > IL8 > VEGF

El monitoreo de la progresión de enfermedad por biopsia de pulmón en múltiples puntos de tiempo sería poco práctico. Un panel de marcadores profibróticos atenuados por CCL2 ha sido identificado y se puede medir *ex vivo* para evaluar actividad de CCL2. Usando los marcadores identificados como sustitutos permitirían monitorear la actividad de anticuerpo durante terapia para ayudar a determinar opciones de tratamiento tales como cantidad y tiempo de dosis. Segundo, los inventores de la presente han determinado una gran magnitud de variabilidad dentro de una población de fibroblasto pulmonar de IPF para perfiles de gen/proteína profibrótica que pueden ser indicativos de subconjuntos de pacientes que responden potencialmente a terapia con anti-CCL2. Usando el panel de genes/proteínas

profibrótico como marcadores sustitutos de enfermedad, se provee una medición cuantitativa y relativamente no invasiva de la progresión de enfermedad.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un método para inhibir por lo menos una proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) humana en un paciente que tiene por lo menos una forma de fibrosis usando por lo menos un antagonista de MCP-1, que comprende administrar una cantidad efectiva inhibidora de MCP-1 de por lo menos un antagonista de MCP-1.

10 2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho antagonista de MCP-1 se selecciona de una molécula pequeña y una proteína.

 3.- El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicha molécula pequeña se selecciona de derivados de indol, derivados de
15 amina cíclica, derivados de ureido, heterocíclicos, anilidas o pirroles funcionales con la capacidad para bloquear la unión de CCL2 a CCR2B, o inhibición de CCR1 o CCL2 mismo.

 4.- El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicha proteína se selecciona de un receptor soluble, un anticuerpo, un
20 péptido, un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo.

 5.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicha proteína además comprende un compuesto o proteína que incrementa la vida media en el suero de dicha proteína.

6.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo comprende por lo menos una región variable que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada y por lo menos una cadena ligera, dicho anticuerpo de MCP-1 comprende regiones variables de
5 cadena pesada y de cadena ligera que comprenden SEQ ID NOS: 27 y 28.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo comprende por lo menos una región variable de cadena pesada y por lo menos una región variable de cadena ligera, dicho anticuerpo comprende todas las secuencias de aminoácidos de la región determinante de
10 complementariedad (CDR) de cadena pesada y cadena ligera de SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14 y 16.

8.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo comprende por lo menos una región variable que comprende por lo menos una cadena pesada y por lo menos una cadena ligera, dicho
15 anticuerpo de MCP-1 comprende regiones variables de cadena pesada y cadena ligera que comprenden SEQ ID NOS: 27 y 28.

9.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo comprende por lo menos una región variable de cadena pesada y por lo menos una región variable de cadena ligera, dicho anticuerpo
20 comprende todas las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada y cadena ligera de SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14 y 16.

10.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde

dicho anticuerpo comprende por lo menos una CDR de cadena pesada o cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14 y 16.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde
5 dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada o cadena ligera de por lo menos una de SEQ ID NO: 2-5 que además comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 6-26; y, opcionalmente asociada funcionalmente
10 con una región de marco de trabajo, además opcionalmente comprende por lo menos CH1, gozne, CH2 o CH3 de una inmunoglobulina humana.

12.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo se une a MCP-1 con una afinidad de por lo menos una seleccionada de por lo menos 10^{-9} M, por lo menos 10^{-10} M, por lo menos 10^{-11}
15 M, o por lo menos 10^{-12} M.

13.- El método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo sustancialmente modula por lo menos una actividad de por lo menos un polipéptido de MCP-1.

14.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde
20 dicha molécula pequeña o proteína se provee como una composición que comprende además por lo menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde

dicho método además comprende administrar por lo menos un compuesto o polipéptido seleccionado de por lo menos uno de marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (SNC),
5 un fármaco del sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para equilibrio de fluido o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco inmunomodulador, un fármaco oftálmico,ótico o nasal, un fármaco tópico, un producto nutricional, una citocina, o un
10 antagonista de citocina.

16.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha cantidad efectiva inhibidora es 0.001-50 mg/kilogramo de las células, tejido, órgano o animal.

17.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde
15 dicha administración es por lo menos por un modo seleccionado de parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica,
20 intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

18.- El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha fibrosis es fibrosis específica de órganos o fibrosis sistémica.

19.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde dicha fibrosis específica de órganos está asociada con por lo menos uno de fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardiaca, fibrosis vascular, fibrosis de la piel, fibrosis ocular, fibrosis de médula ósea u otras fibrosis.

20.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis pulmonar está asociada con por lo menos una de fibrosis pulmonar inducida por fármacos, asma, sarcoidosis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

21.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis hepática está asociada con por lo menos una de cirrosis, esquistomasomiasis o colangitis.

22.- El método de conformidad con la reivindicación 21, en donde dicha cirrosis se selecciona de cirrosis post-hepatitis C, cirrosis biliar primaria.

23.- El método de conformidad con la reivindicación 22, en donde dicha colangitis es colangitis esclerosante.

24.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis renal está asociada con glomeruloesclerosis de lupus.

25.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis cardiaca está asociada con por lo menos un tipo de

infarto de miocardio.

26.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis vascular está asociada con por lo menos una de restenosis arterial post-angioplastia o aterosclerosis.

5 27.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis de la piel está asociada con por lo menos una de queloide o dermatopatía fibrosante nefrogénica.

28.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis ocular está asociada con por lo menos una de fibrosis
10 retro-orbital, cirugía post-cataratas o vitreorretinopatía proliferativa.

29.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha fibrosis de médula ósea está asociada con por lo menos una de mielofibrosis idiopática o mielofibrosis inducida por fármacos.

30.- El método de conformidad con la reivindicación 19, en
15 donde las otras fibrosis se seleccionan de enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren o dermatomiositis.

31.- El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde dicha fibrosis sistémica se selecciona de esclerosis sistémica y enfermedad de injerto versus hospedero.

20 32.- Cualquier invención descrita aquí.

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

20 <213> Homo sapiens

<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)

50 <223> Conjugate position, e.g. biotin or PEG-biotin

<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

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

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

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

20 <210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> human

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

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)

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

50 <220>
<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

60 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

5 Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

25 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

30 <210> 3
<211> 109
<212> PRT
<213> Human

35 <220>
<221> FR1
<222> (1)..(23)

40 <220>
<221> CDR1
<222> (24)..(35)

45 <220>
<221> FR2
<222> (36)..(46)

50 <220>
<221> CDR2
<222> (47)..(57)

55 <220>
<221> FR3
<222> (58)..(89)

60 <220>
<221> VARIANT
<222> (90)..(90)
<223> X may be H or Q

<220>
<221> CDR3
<222> (90)..(97)

<220>
<221> VARIANT
<222> (94)..(94)
<223> X may be Glu, Gln, Asp, Ser, Thr, or Phe

<220>

<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
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 40 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 45 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 50 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 55 Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 60 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Human

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

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

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

15 <220>
<221> CDR2
<222> (47) .. (66)

20 <220>
<221> FR3
<222> (67) .. (98)

25 <220>
<221> CDR3
<222> (99) .. (110)

30 <220>
<221> FR4
<222> (111) .. (120)

<400> 4

30 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

50 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

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

35
<220>
<221> VARIANT
<222> (91)..(91)
<223> Xaa may be Asp or Thr

40
<220>
<221> VARIANT
<222> (92)..(92)
<223> Xaa may be Arg or Ala

45
<220>
<221> VARIANT
<222> (93)..(93)
<223> Xaa may be Gln or Phe

50
<220>
<221> VARIANT
<222> (96)..(96)
<223> Xaa may be Thr or Ala

55
<220>
<221> VARIANT
<222> (97)..(97)
<223> Xaa may be Ala, Gly, or Ser

60
<220>
<221> FR4
<222> (98)..(107)

<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
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa
85 90 95
25 Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105
30
<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
<213> Human
45
<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
60
<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Human
60
<400> 8

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

15 <400> 9
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

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

45 His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn
1 5

50 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

55 <400> 18

Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr
1 5 10

60 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

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

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

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

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

25 <400> 21
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)

<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>
 25 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa may be Ser or Thr
 <220>
 30 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa may be Gly or Asn
 <220>
 35 <221> VARIANT
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa may be Ala or Thr
 <220>
 40 <221> VARIANT
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa may be Gly, Ser, or Thr
 <220>
 45 <221> VARIANT
 <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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> Xaa may be Ala, Gly, or Ser
5
<400> 25

Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa
1 5 10
10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Human

<220>
<221> VARIANT
20 <222> (2)..(2)
<223> Xaa may be Gly or Phe

<220>
<221> VARIANT
25 <222> (5)..(5)
<223> Xaa may be Ser or Arg

<220>
<221> VARIANT
30 <222> (9)..(9)
<223> Xaa may be Ile or Met

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

<210> 27
40 <211> 119
<212> PRT
<213> Human

45 <220>
<221> FRAMEWORK1
<222> (1)..(25)
<223> CDR3

50 <220>
<221> CDR1
<222> (26)..(35)
<223> CDR1

55 <220>
<221> FRAMEWORK2
<222> (36)..(46)
<223> CDR3

60 <220>
<221> CDR2
<222> (47)..(66)
<223> CDR2

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

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

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

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
20 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
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
35 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
40 85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
45 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

50 <210> 28
<211> 109
<212> PRT
55 <213> Human

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

<220>
<221> FRAMEWORK1

```

<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

```

FIG. 1

Número de veces relativo
($2^{-\Delta\Delta ct}$)

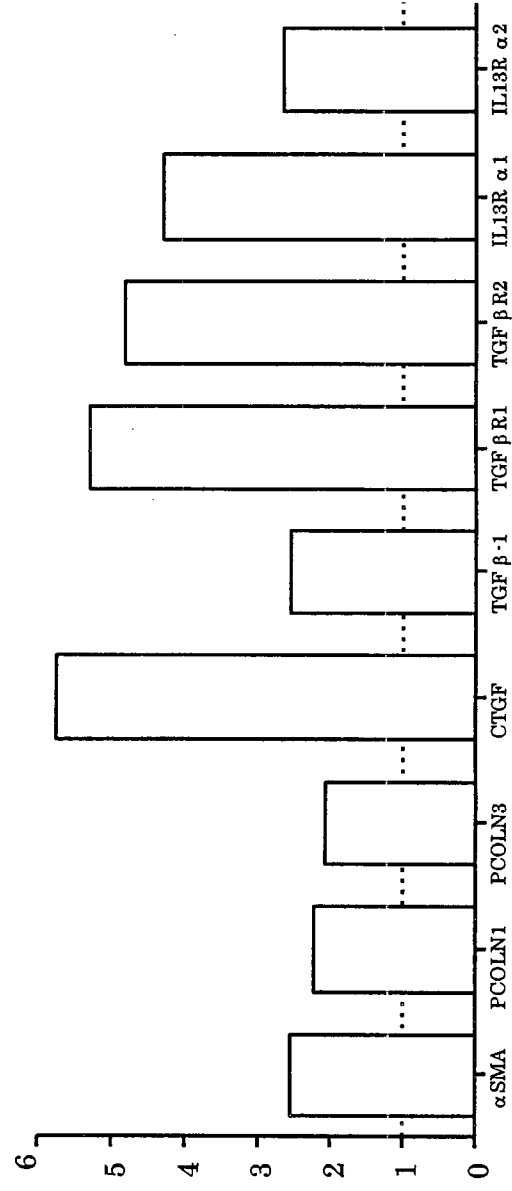


FIG. 2

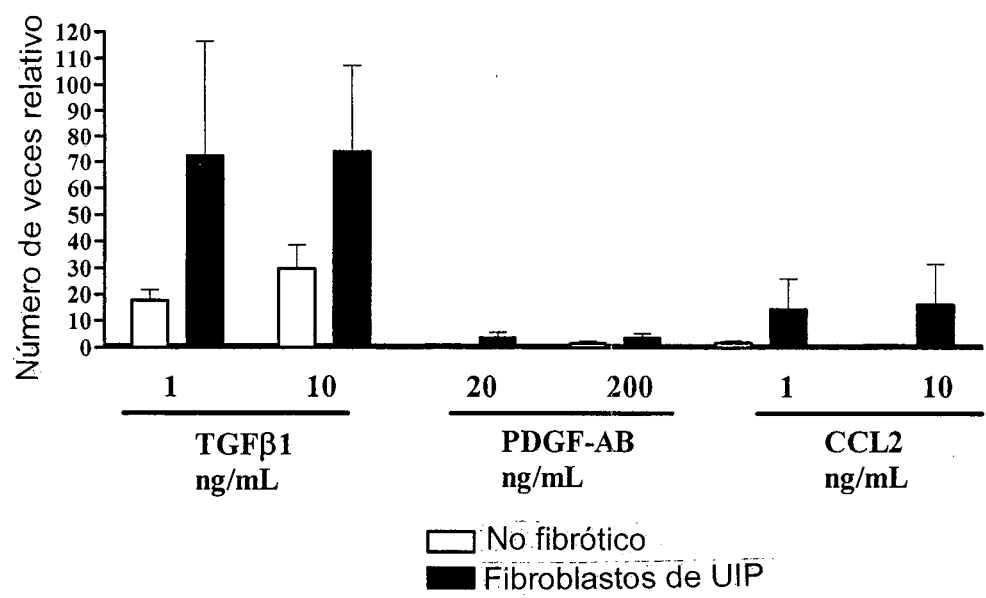
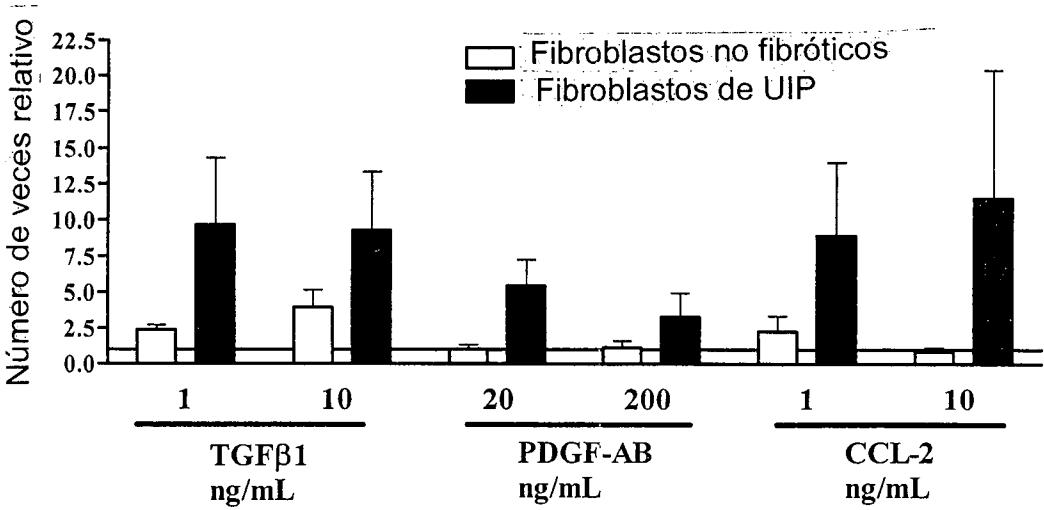


FIG. 3

A.



B.

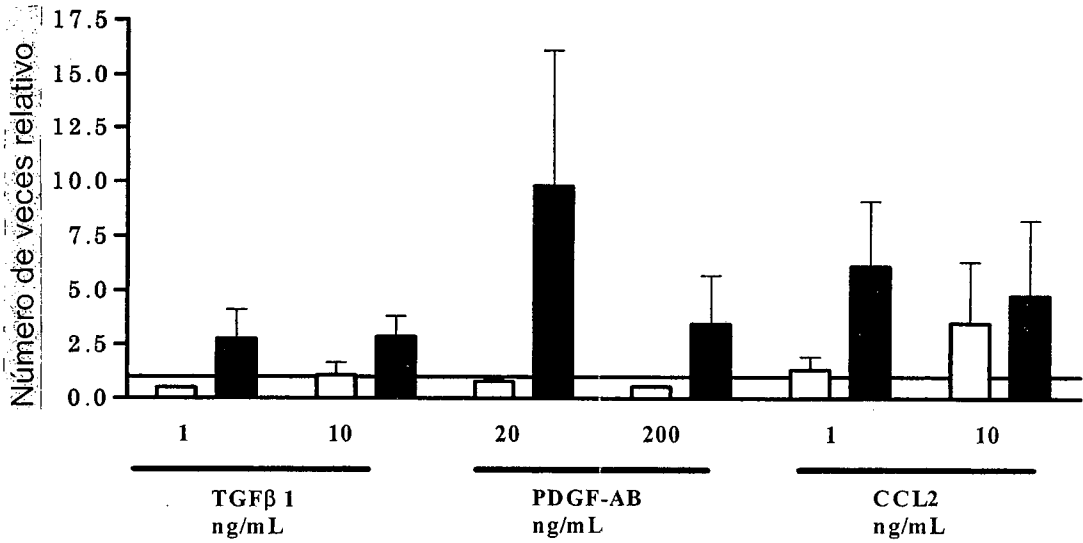


Fig. 4

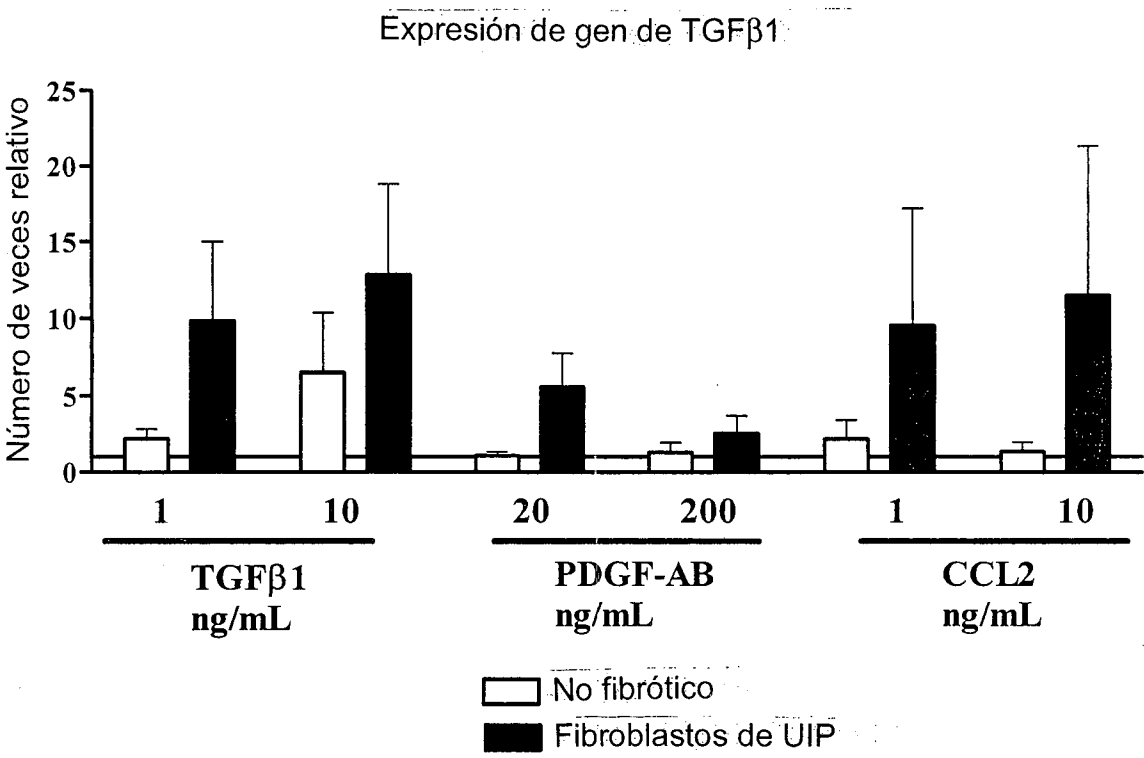


Fig. 5

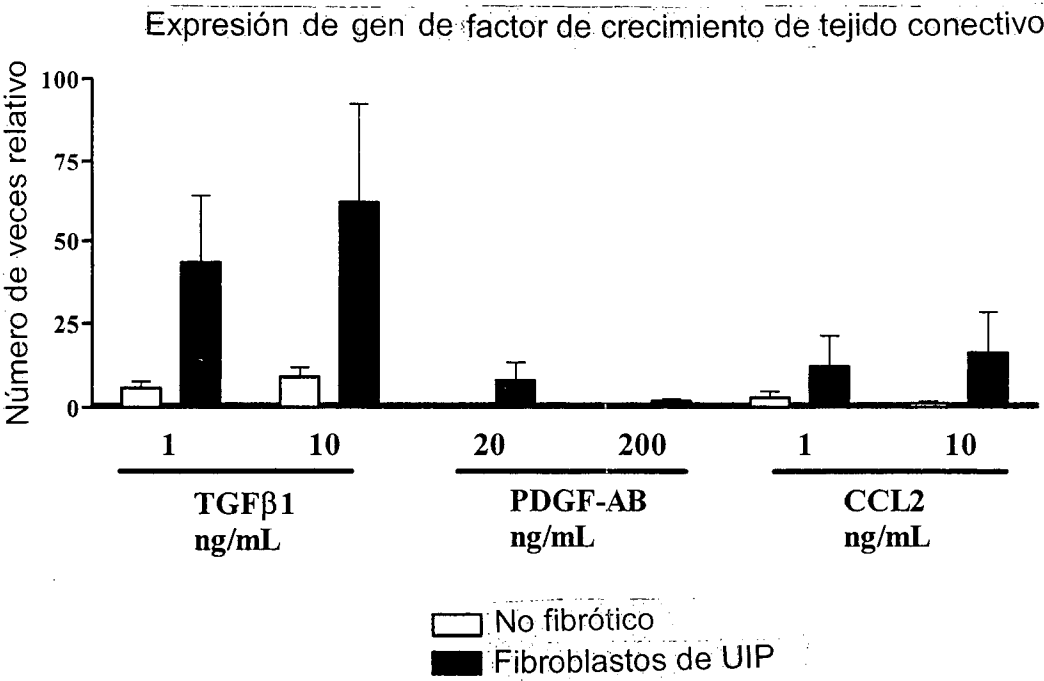


Fig. 6

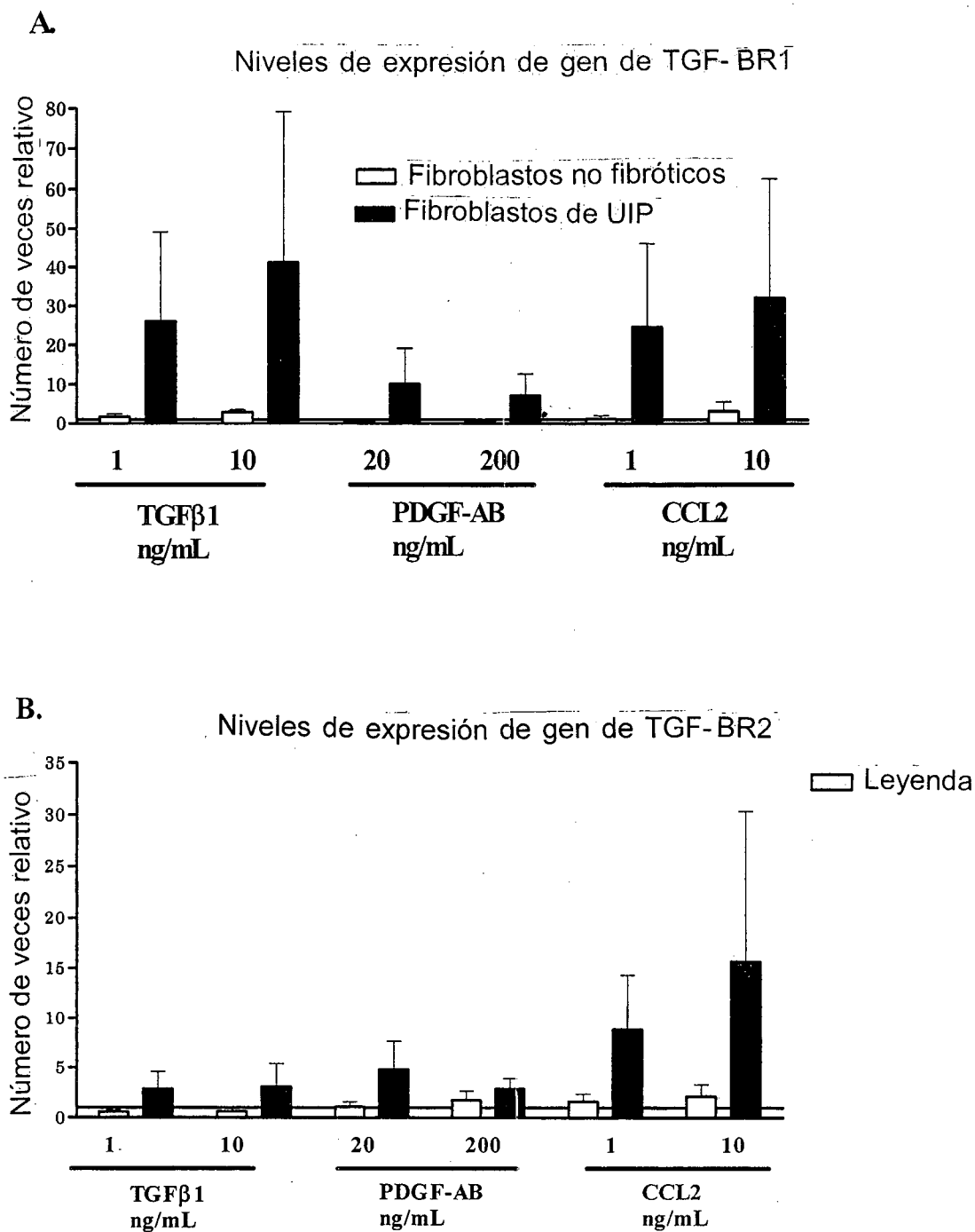
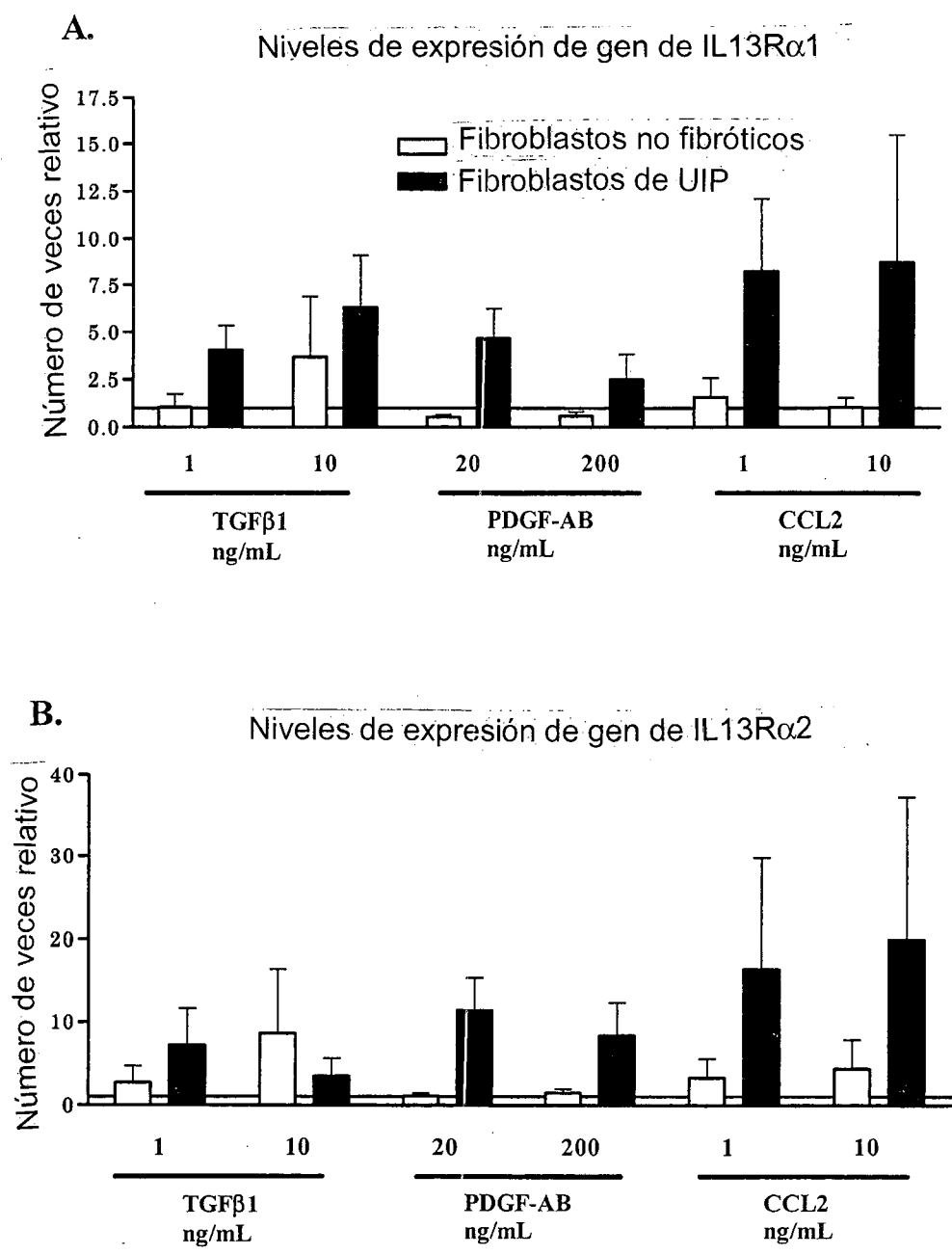


Fig. 7



PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.022.197 MT/FOP 20070701/0.20.5.10
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	CEN5158WOPCT
I	Title of Invention	CCR2 ANTAGONISTS FOR TREATMENT OF FIBROSIS
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	CENTOCOR
II-5	Address	200 Great Valley Parkway Malvern, PA 91355 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	732-524-2517
II-9	Facsimile No.	732-524-2808
II-10	e-mail	JNJINTLPATENT@corus.jnj.com

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	DAS, Anuk
III-1-5	Address	CENTOCOR 200 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	MURRAY, Lynn
III-2-5	Address	CENTOCOR 200 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	SYED, Fahrat
III-3-5	Address	CENTOCOR 200 Great Valley Parkway Malvern, PA 19355 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	JOHNSON, Philip S.
IV-1-2	Address	Johnson & Johnson One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, New Jersey 08933 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	743-524-2517
IV-1-4	Facsimile No.	732-524-2808
IV-1-5	e-mail	ktownse@corus.jnj.com
IV-2	Additional agent(s)	agent
IV-2-1	Name (LAST, First)	TOWNSEND, Guy Kevin
IV-2-2	Address	Johnson & Johnson One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, New Jersey 08933 United States of America
IV-2-3	Telephone No.	732-524-2517
IV-2-4	Facsimile No.	732-524-2808
IV-2-5	e-mail	ktownse2@corus.jnj.com
IV-2-6	Agent's registration No.	34,033
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	05 October 2006 (05.10.2006)
VI-1-2	Number	60/828,253
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-3	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.		
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	54	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	7	-
IX-7	TOTAL	70	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Guy Kevin Townsend/
X-1-1	Name (LAST, First)	TOWNSEND, Guy Kevin
X-1-2	Name of signatory	
X-1-3	Capacity	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 May 2008 (22.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/060783 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(74) Agents: **JOHNSON, Philip S.** et al.; Johnson & Johnson,
One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, New Jersey 08933 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/080542

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): 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, DO, 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, ME, 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.

(22) International Filing Date: 5 October 2007 (05.10.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/828,253 5 October 2006 (05.10.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **CENTOCOR** [US/US]; 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

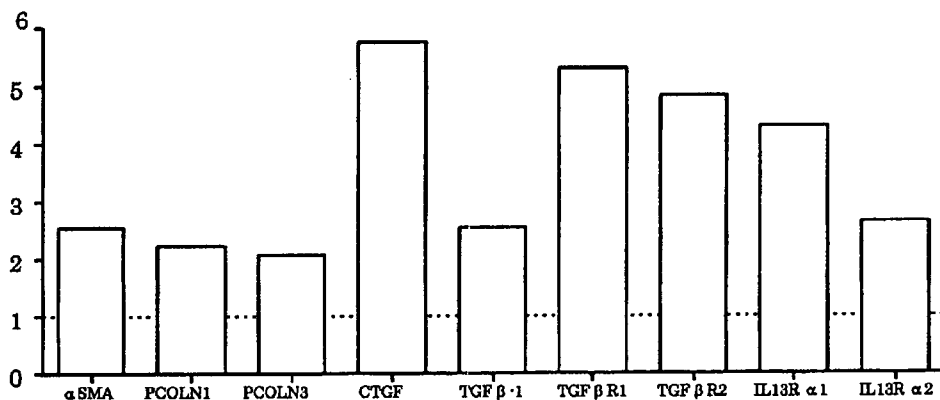
(75) Inventors/Applicants (for US only): **DAS, Anuk** [US/US]; Centocor, 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US). **MURRAY, Lynn** [US/US]; Centocor, 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US). **SYED, Fahrat** [US/US]; Centocor, 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(54) Title: CCR2 ANTAGONISTS FOR TREATMENT OF FIBROSIS

Relative Fold Change
($2^{-\Delta\Delta CT}$)



(57) Abstract: Anti-MCP-1/CCR2 antagonist therapy is provided for the control or reversal of fibrosis related diseases, including, e.g., but not limited to MCP-1/CCR2 antagonist therapy for the modulation of profibrotic markers associated with fibrotic processes including collagen matrix deposition and alveolar collapse.

WO 2008/060783 A2

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 May 2008 (22.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/060783 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/080542

(22) International Filing Date: 5 October 2007 (05.10.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/828,253 5 October 2006 (05.10.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **CENTOCOR** [US/US]; 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 91355 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DAS, Anuk** [US/US]; Centocor, 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US). **MURRAY, Lynn** [US/US]; Centocor, 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US). **SYED, Fahrat** [US/US]; Centocor, 200 Great Valley Parkway, Malvern, PA 19355 (US).

(74) Agents: **JOHNSON, Phillip S.** et al.; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, New Jersey 08933 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): 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, DO, 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, ME, 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.

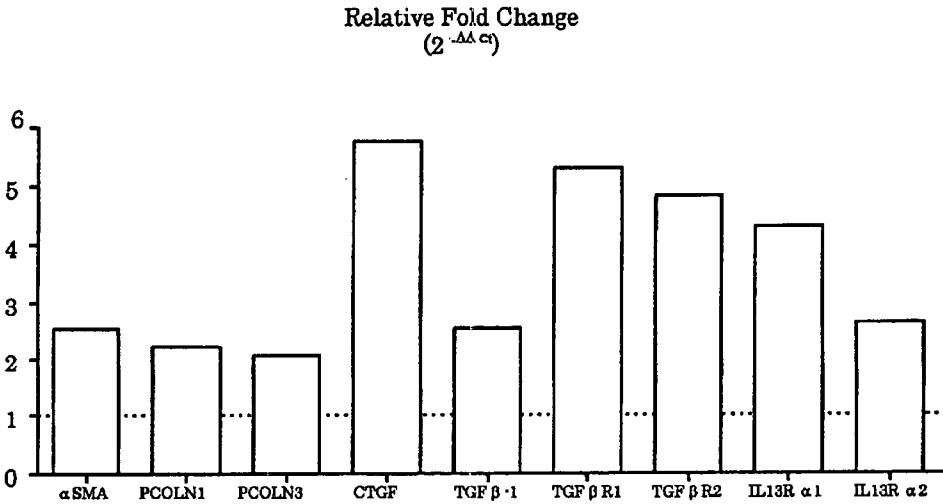
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 23 October 2008

(54) Title: CCR2 ANTAGONISTS FOR TREATMENT OF FIBROSIS



(57) Abstract: Anti-MCP-1/CCR2 antagonist therapy is provided for the control or reversal of fibrosis related diseases, including, e.g., but not limited to MCP-1/CCR2 antagonist therapy for the modulation of profibrotic markers associated with fibrotic processes including collagen matrix deposition and alveolar collapse.

WO 2008/060783 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/080542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 G01N33/50 A61P17/02 A61P11/00

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)

A61K G01N A61P

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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2006/125201 A (CENTOCOR INC [US]; KRUSZYNSKI MARIAN F [US]; SWEET RAYMOND [US]; TSUI) 23 November 2006 (2006-11-23) claims 1-17 page 39, line 11 - page 42, line 26 page 47, lines 19-31 page 48, line 14 - page 49, line 21 page 51, lines 1-8 the whole document	1-5, 12-32
X	EP 1 325 751 A (DAIICHI SEIYAKU CO [JP] DAIICHI SEIYAKU CO [JP]; EGASHIRA KENSUKE [JP]) 9 July 2003 (2003-07-09) claims 1-9 Example paragraphs [0022] - [0028] page 4, paragraph 29 ----- -/--	1-5, 12-32



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 July 2008

Date of mailing of the international search report

11/08/2008

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 nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fayos, Cécile

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/080542

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERREIRA AHALIA M ET AL: "Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency." THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY AUG 2006; vol. 126, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 1900-1908, XP002489418 ISSN: 0022-202X the whole document page 1901, left-hand column, lines 1-6 page 1904, right-hand column, paragraph 1 page 1905, right-hand column, paragraph 3	1-5, 12-32
X	US 2006/039913 A1 (DAS ANUK [US] ET AL) 23 February 2006 (2006-02-23) claims 1-34 paragraph [0019] page 24, right-hand column, lines 17-20, paragraph 203 paragraphs [0205] - [0209] page 26, paragraph 210	1-5, 12-32
X	WO 99/07351 A (ZENECA LTD [GB]; BARKER ANDREW JOHN [GB]; KETTLE JASON GRANT [GB]; FAU) 18 February 1999 (1999-02-18) cited in the application page 2, line 1 - page 11, line 11 page 18, line 17 - page 19, line 2 page 1, line 7 - line 19	1-5, 12-32
X	US 2003/096705 A1 (LABORDE EDGARDO [US] ET AL) 22 May 2003 (2003-05-22) page 11, paragraphs 163, 164 claims 1-57	1-5, 12-32
X	WO 2006/085961 A (CENTOCOR INC [US]; DAS ANUK [US]; CARTON JILL M [US]) 17 August 2006 (2006-08-17) claims 1-62 page 60, lines 25-27 page 61 - page 64	1-5, 12-32

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 6-11; 1-5, 12-32 partially

The specific sequences of claims 6-11 have, according to PCT Rule 13ter.1.d, not been searched since the Sequence Listing as present in the description does not comply with the WIPO Standard ST 25 prescribed in the administrative instructions under Rule 5.2. The Sequence Listing has been furnished neither in paper form nor in machine readable form as provided for in the same instructions and the applicant has not remedied the disclosed deficiencies within the time fixed in the invitation pursuant to PCT Rule 13ter.1.a.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-5, 12-32 (partially)

Present claim 1-5, 12-32 relate to compounds which have a given desired property or effect, namely "MCP-1 antagonists" (i.e. are merely defined by their ability to antagonise MCP-1 - result to be achieved). However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such compounds having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. Furthermore, dependent claims 2-5 fail to provide a definition of the MCP-1 antagonist to be used in technical terms (i.e. in terms of a structure or sequence). This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

The search of claims 1-5, 12-32 was consequently restricted to the broad concept of compounds having the desired property or effect.

In addition, the initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of the claims may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT). For these reasons, the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 1-5, 12-32, which was restricted to the broad concept of MCP-1 antagonists (in particular antibodies) for the treatment of fibrosis. Some (but not all) relevant documents disclosing MCP-1 antagonists for the treatment of fibrosis have been cited.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/080542

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.: 6-11; 1-5, 12-32 partially
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 1-5, 12-32 (partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 an 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/US2007/080542

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006125201	A	23-11-2006	NONE	
EP 1325751	A	09-07-2003	AU 9230101 A CA 2425765 A1 CN 1469756 A WO 0230464 A1 NO 20031650 A US 2005053603 A1	22-04-2002 11-04-2003 21-01-2004 18-04-2002 05-06-2003 10-03-2005
US 2006039913	A1	23-02-2006	NONE	
WO 9907351	A	18-02-1999	AT 244007 T AU 745907 B2 AU 8638198 A BR 9811818 A CA 2297290 A1 CN 1265591 A CZ 20000431 A3 DE 69816091 D1 DE 69816091 T2 DK 1003504 T3 EP 1003504 A2 ES 2201517 T3 HK 1027979 A1 HR 20000061 A2 HU 0004301 A2 ID 23666 A JP 3863722 B2 JP 2001513494 T NO 20000573 A NZ 502056 A PL 338948 A1 PT 1003504 T RU 2217142 C2 SK 1672000 A3 TR 200000289 T2 UA 63968 C2 US 6441004 B1 ZA 9807090 A	15-07-2003 11-04-2002 01-03-1999 15-08-2000 18-02-1999 06-09-2000 17-05-2000 07-08-2003 19-05-2004 13-10-2003 31-05-2000 16-03-2004 31-10-2003 31-12-2000 28-12-2001 11-05-2000 27-12-2006 04-09-2001 04-02-2000 01-02-2002 04-12-2000 28-11-2003 27-11-2003 11-12-2000 21-08-2000 15-09-2000 27-08-2002 08-02-1999
US 2003096705	A1	22-05-2003	US 2004198719 A1 US 2004077680 A1 WO 2005014600 A1	07-10-2004 22-04-2004 17-02-2005
WO 2006085961	A	17-08-2006	CA 2572289 A1 EP 1784425 A2	17-08-2006 16-05-2007

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s):
(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.):

CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044
United States of America

hereby appoint(s) the following person as: ☒ agent ☐ common representative

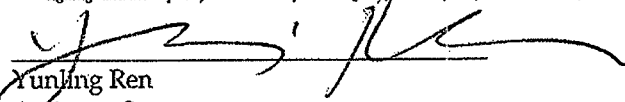
Name and address
(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DOW, KENNETH J. (Reg. No. 32,890)
Johnson & Johnson
Patent Law Department
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933-7003
United States of America

to represent the undersigned before ☒ all the competent International Authorities
☐ the International Searching Authority only
☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signature(s) (where there are several persons, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading this power):


Yunling Ren
Assistant Secretary
Centocor Ortho Biotech Inc.

Date: March 27, 2009

* * * COMMUNICATION RESULT REPORT (MAR. 27. 2009 11:54AM) * * *

FAX HEADER 1: J&J PATENT INFO SVCS
FAX HEADER 2: 17325242808

TRANSMITTED/STORED : MAR. 27. 2009 11:53AM

FILE MODE	OPTION	ADDRESS	RESULT	PAGE
8208 MEMORY TX		41223388270	OK	6/6

REASON FOR ERROR
E-1) HANG UP OR LINE FAIL
E-3) NO ANSWERE-2) BUSY
E-4) NO FACSIMILE CONNECTION**Johnson & Johnson**CORPORATE HEADQUARTERS
PATENT LAW DEPARTMENT
ONE JOHNSON & JOHNSON PLAZA
NEW BRUNSWICK, NEW JERSEY 08933

FACSIMILE TRANSMISSION COVER SHEET

TO: The International Bureau of WIPO
Attn: Athina Nickitas-Etienne

FACSIMILE NUMBER: 011 41 22 338 8270

FROM: Donna M. Sposato

TELEPHONE NO.: (732) 524-3990 ROOM NO.: WH 3212 E

DATE: March 27, 2009

FACSIMILE NUMBER: (732) 524-2808

NUMBER OF PAGES INCLUDING THIS COVER SHEET: 6

COMMENTS: RE: CEN5158WOPCT
International App. No.: PCT/US2007/080542

Please see the attached PCT GENERAL POWER OF ATTORNEY, REQUEST FOR RECORDING OF A CHANGE IN APPLICANT UNDER RULE 92bis and INVENTORS' NAME, ADDRESS AND CITIZENSHIP CORRECTIONS UNDER RULE 92bis.

Thank you,

Donna M. Sposato

THIS MESSAGE IS INTENDED ONLY FOR THE INDIVIDUAL OR ENTITY TO WHICH IT IS ADDRESSED AND MAY CONTAIN INFORMATION THAT IS PRIVILEGED, CONFIDENTIAL AND EXEMPT FROM DISCLOSURE UNDER APPLICABLE LAW. IF THE READER OF THIS MESSAGE IS NOT THE INTENDED RECIPIENT, OR THE EMPLOYEE OR AGENT RESPONSIBLE FOR DELIVERING THE MESSAGE SOLELY TO THE INTENDED RECIPIENT, YOU ARE HEREBY NOTIFIED THAT ANY DISSEMINATION, DISTRIBUTION OR COPYING OF THIS COMMUNICATION IS STRICTLY PROHIBITED. IF YOU HAVE RECEIVED THIS COMMUNICATION IN ERROR, PLEASE NOTIFY US IMMEDIATELY BY TELEPHONE AND RETURN THE ORIGINAL MESSAGE TO US AT THE ABOVE ADDRESS VIA THE U.S. POSTAL SERVICE. THANK YOU.

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s):

(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.):

CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044
United States of America

hereby appoint(s) the following person as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address

(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

DOW, KENNETH J. (Reg. No. 32,890)
Johnson & Johnson
Patent Law Department
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933-7003
United States of America

to represent the undersigned before

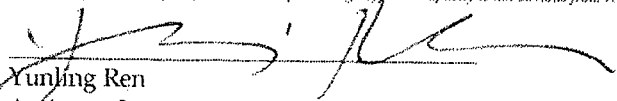
☒ all the competent International Authorities

☐ the International Searching Authority only

☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office United States Patent and Trademark Office as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signature(s) (where there are several persons, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs. If such capacity is not obvious from reading this power):


Yunling Ren
Assistant Secretary

Centocor Ortho Biotech Inc.

Date: March 27, 2009

I hereby certify that this paper is being facsimile transmitted to the International Bureau on the date below to

Facsimile Telephone Number 9 011 +41 22 338 7466 8270 SMS

Donna M. Sposato

(Name of Person Signing Certificate)

(Signature)

March 27, 2009

(Date)

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

Docket No. : CEN5158WOPCT
Applicant : CENTOCOR
New Applicant : Centocor Ortho Biotech Inc.
International
Appln. No. : PCT/US2007/080542
International
Filing Date : 05 October 2007
Title :

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20 Switzerland

REQUEST FOR RECORDING OF A CHANGE IN APPLICANT UNDER RULE 92bis

Dear Sir:

The applicant has changed since the subject PCT application was filed. New applicant requests that the International Bureau record the change as follows:

CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.
800/850 Ridgeview Drive
Horsham PA 19044

In accordance with Rule 90.3, new applicant herewith submits the related Merger document in support of this request.

Please notify all Offices and PCT authorities of this change and should there be any fees associated with this change, the International Bureau is hereby authorized to charge EP Deposit Account Number 28300161.

Respectfully submitted,



Kenneth J. Dow Reg. No. 32,890
Vice President
Centocor Ortho Biotech Inc.

Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933-7003
(732) 524-1685 – Tel.
(732) 524-2808 – Fax

Dated: 20 March 2009

IN THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicant : Centocor Ortho Biotech Inc.
International Application No. : PCT/US2007/080542
International Filing Date : 5 October 2007
International Publication No. : WO/2008/060783
International Publication Date: 22 May 2008
Title: CCR2 ANTAGONISTS FOR TREATMENT OF FIBROSIS

I hereby certify that this correspondence is being transmitted via facsimile to The International Bureau of WIPO, Fax No. 011-41-22-338-8270

March 27, 2009

(date of Transmission)

Donna M. Sposato

(Name of person signing certificate)

/Donna M. Sposato/

(Signature)

March 27, 2009

(Date of Signature)

International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

INVENTORS' NAME, ADDRESS AND CITIZENSHIP CORRECTIONS UNDER
RULE 92bis

Dear Sir:

With respect to the subject international application, the inventors' addresses and citizenships were incorrectly filed in the PCT. Furthermore, two inventors' names were also incorrectly submitted on the PCT Request. The following is a submission as to the corrected information.

NAME CORRECTION:

Names as filed in PCT Request

Lynn MURRAY

Fahrat SYED

Correct Name

Lynne MURRAY

Farhat SYED

ADDRESS CHANGE:

Inventor

As filed in PCT Request

As Corrected

Anuk DAS

Centocor, 200 Great Valley
Parkway, Malvern PA 19355,
United States of America

1307 Berwyn-Paoli Road,
Berwyn, PA 19312, USA

Lynne MURRAY

Centocor, 200 Great Valley
Parkway, Malvern PA 19355,
United States of America

733 Crooked Lane, King of
Prussia, PA 19406, USA

Farhat SYED

Centocor, 200 Great Valley
Parkway, Malvern PA 19355,
United States of America

13 Billers Chase, Beaulieu Park,
Chelmsford, Essex CM1 6BD
England

CITIZENSHIP CORRECTION:

Inventor

As filed in PCT Request

As Corrected

Anuk DAS

US

GB

Lynne MURRAY

US

GB

Farhat SYED

US

GB

Please record these changes and notify all Offices and PCT authorities. Should there be any fees associated with this document, the Patent Office is hereby authorized to charge Deposit Account 28300161.

PCT/US2007/080542

Respectfully submitted,

/Kenneth J. Dow Reg. No. 32,890/
Kenneth J. Dow, Reg. No. 32,890
Vice President
Centocor Ortho Biotech Inc.

Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933-7003
Phone: (732) 524-1685
Fax: (732) 524-2808
Dated: March 26, 2009

I hereby certify that this paper is being facsimile transmitted to the International Bureau on the date below to
Facsimile Telephone Number 9 011 +41 22 338 7455 8270 (SMS)

Donna M. Sposato

(Name of Person Signing Certificate)

Donna M. Sposato

(Signature)

March 27, 2009

(Date)

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO

Docket No. : CEN5158WOPCT
Applicant : CENTOCOR
New Applicant : Centocor Ortho Biotech Inc.
International
Appln. No. : PCT/US2007/080542
International
Filing Date : 05 October 2007
Title :

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20 Switzerland

REQUEST FOR RECORDING OF A CHANGE IN APPLICANT UNDER RULE 92bis

Dear Sir:

The applicant has changed since the subject PCT application was filed. New applicant requests that the International Bureau record the change as follows:

CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.
800/850 Ridgeview Drive
Horsham PA 19044

In accordance with Rule 90.3, new applicant herewith submits the related Merger document in support of this request.

Please notify all Offices and PCT authorities of this change and should there be any fees associated with this change, the International Bureau is hereby authorized to charge EP Deposit Account Number 28300161.

Respectfully submitted,

Kenneth J. Dow

Kenneth J. Dow Reg. No. 32,890
Vice President
Centocor Ortho Biotech Inc.

Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933-7003
(732) 524-1685 – Tel.
(732) 524-2808 – Fax

Dated: 20 March 2009



No. 09-036246- -00000-0000

Fecha: 2009-04-08 13:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 125

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ◇ Descripción de la invención [X]
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha 2009-04-08-9

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D` ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	9 36246
	Solicitud internacional	pct/us2007/080542
	Fecha inicio fase nacional	05/05/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 5893

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. Debe aclarar el nombre del solicitante, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional.

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

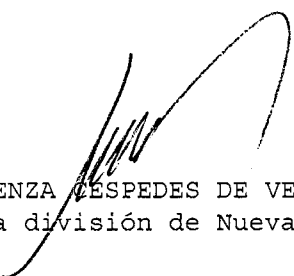
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 36246



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
jfernand **22 MAYO 2009**

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

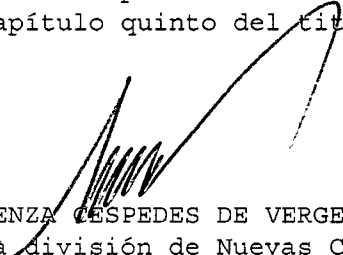
Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 36246
	Solicitud internacional	pct/us2007/080542
	Fecha inicio fase nacional	05/05/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 5 8 9 4

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha_____
jfernand

22 MAYO 2009