

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫抑制の必要があり、免疫抑制剤で処置される哺乳動物において免疫抑制剤によって誘発される腎炎を処置または防止する方法であって、哺乳動物に、薬剤の免疫抑制活性を実質的に妨げずに免疫抑制剤の腎毒性作用を緩和するのに十分な治療有効量の TGF- α アンタゴニストを投与することを含んでなる、方法。

【請求項 2】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

哺乳動物に投与する場合、免疫抑制剤が TGF- β の発現を誘導する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

免疫抑制剤が、シクロスポリン、タクロリムス、およびシロリムス、または薬学的に許容可能なその誘導體からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

シクロスポリンがシクロスポリン A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

TGF- α アンタゴニストが、抗 TGF- α 抗体、抗 TGF- β 受容体抗体、および可溶性 TGF- β 受容体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

抗体が 1D11 またはそのヒトもしくはヒト化誘導體である、請求項 6 に記載の方法。 20

【請求項 8】

抗体が CAT192 またはその誘導體である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

哺乳動物が自己免疫障害を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

哺乳動物が移植を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

移植が同種移植片である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

移植が、心臓、腎臓、肺、肝臓、角膜、骨髄、血管および膵島細胞移植からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。 30

【請求項 13】

TGF- α アンタゴニストが、免疫抑制剤の非存在下で腎炎を処置するために推奨される用量より低い用量で投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

TGF- α アンタゴニストが投与される用量が、免疫抑制剤の非存在下で腎炎を処置するために推奨される用量より少なくとも 20% 低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

TGF- α アンタゴニストが、免疫抑制剤の非存在下で通常投与される最大値治療有効量の少なくとも 30% 未満の用量で投与される、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 16】

TGF- α アンタゴニストが、ラットに投与される場合、1D11 抗体の 2 mg/kg 体重に等価な用量未満の用量で投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

TGF- α アンタゴニストが、ラットに投与される場合、1D11 抗体の 1 mg/kg 体重に等価な用量で投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

抗 TGF- α 抗体をヒトに投与することを含んでなる、ヒトを処置する方法であって、ヒトが、移植を有し、かつシクロスポリン、タクロリムス、およびシロリムス、または薬 50

学的に許容可能なその誘導体からなる群から選択される免疫抑制剤による免疫抑制療法を経験している、方法。

【請求項 19】

TGF - 抗体の投与による拒絶の危険性が治療的に許容可能である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

免疫抑制剤の腎毒性作用の低減が治療的に許容可能である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

免疫抑制を必要とする患者に投与される免疫抑制剤によって誘発される腎炎を処置または防止するための TGF - アンタゴニストの使用。

10

【請求項 22】

免疫抑制を必要とする患者に投与される免疫抑制剤によって誘発される腎炎を処置または防止するための医薬品の製造における TGF - アンタゴニストの使用。

【請求項 23】

免疫抑制剤の腎毒性を検出する方法であって、

(a) 免疫抑制剤 (immunosuppressive agent) が投与されている哺乳動物から生物学的サンプルを入手すること、および

(b) TGF - 、NOX - 1、p22^{phox}、RAC - 1、SOD、およびTRX からなる群から選択される一つもしくはそれ以上の分子の発現レベルを決定すること、を含んでなり、

20

発現レベルが哺乳動物に対して腎毒性であるかどうかを示す、方法。

【請求項 24】

免疫抑制剤の腎毒性を低減する能力について組成物の化合物を評価する方法であって、

(a) 免疫抑制剤 (immunosuppressive agent) および試験化合物または組成物が投与されている哺乳動物から生物学的サンプルを入手すること、および

(b) TGF - 、NOX - 1、p22^{phox}、RAC - 1、SOD、およびTRX からなる群から選択される一つもしくはそれ以上の分子の発現レベルを決定すること、を含んでなり、

発現レベルが、試験化合物または組成物は、免疫抑制剤の腎毒性を低減するのに有効であるかどうかを示す、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2004年9月22日に提出された米国仮出願第60/612,187号明細書(参考としてその全体が本明細書に引用される)に対し優先権を主張する。

【0002】

本発明の技術分野は、臓器移植(移植学)、臨床免疫学、および腎臓病学の分野に関する。本発明は、シクロスポリンを含む所定の免疫抑制剤の腎毒性の副作用を低減する方法に関する。

【背景技術】

40

【0003】

免疫抑制は、組織/臓器移植ならびに自己免疫および炎症性障害の治療における拒絶の危険性を低減するために日常的に使用される。シクロスポリンA(CsA)は、現在最も広範に使用されている免疫抑制剤である。タクロリムス(TAC)(FK506としても公知である)およびシロリムス(sirrolimus)(ラパマイシンとしても公知である)は、他の2つの一般に使用される免疫抑制薬である。多様な免疫抑制療法のレビューについては、例えば、シュウアマン(Schuurman)ら(2001年)Modern Immunosuppressives(Milestones in Drug Therapy), Birkhauser, Boston; およびセイグ(Sayegh)ら(2001年)Current and Future Immunosuppre

50

ssive Therapies Following Transplantation, Kluwer Academic Publishersを参照のこと。

【0004】

改善された治療ストラテジーが開発されているが、免疫抑制剤に関連する有害な副作用については重要な課題として残されたままである。腎毒性は、多くの免疫抑制療法、特に、カルシニューリンインヒビターを利用する療法の重大な合併症である。

【0005】

急性シクロスポリン(CsA)毒性は、糸球体濾過量(GFR)および腎血流の減少、低マグネシウム血症、ならびに尿細管損傷を特徴とする腎炎を引き起こす。同様に、慢性CsA毒性は、間質の繊維化、管萎縮、および動脈虚血などの管変化を特徴とする進行性の状態の腎機能障害を生じる。これらの変化は、最終的に、末期の腎疾患および腎不全をもたらす。腎毒性は、例えば、タクロリムス(例えば、イングリッシュ(English)ら(2002年)Am. J. Transplant., 2:769-273を参照のこと)およびシロルムス(siroliumus)(例えば、フェルベンザ(Fervenza)ら(2004年)Nephrol. Dial. Transplant., 19(5):1288-1292を参照のこと)で処置された移植レシipientにおいて観察された。

10

【0006】

最近の研究は、CsA、タクロリムス、およびラパマイシンを含む所定の免疫抑制薬の免疫抑制活性ならびに/または腎毒性の両方のメディエーターとしてのトランスフォーミング増殖因子-(TGF-)に関与している(カナ(Khanna)ら(2000年)Transplantation, 70(4):90-694)。抗TGF-抗体の投与によるCsA腎毒性の非移植モデルにおいてTGF-をブロックすることによって、組織線維化全体が実質的に低減することが示された(カナ(Khanna)ら(1999年)Transplantation, 67:882-889;イスラム(Islam)(2001年)59:498-506;リング(Ling)ら(2003年)J. Am. Soc. Nephrol., 14:377-388)が、しかし、それはまた、薬剤の免疫抑制効果も阻害する。

20

【0007】

腎毒性を低減する一方、このクラスの薬物における免疫抑制を保持することを目的とした多くの実験ストラテジーが試験されている。TGF-に関連するが間接的な機構によって腎毒性を和らげ得る薬剤として:ミコフェノール酸モフェチル(MMF)(シハブ(Shihab)ら(2003年)Am. J. Transplant., 3:1550-1559)、スピロラクトン(フェリア(Feria)ら(2003年)Kidney Int., 63:43-52)、ロサルタン(ヤン(Yang)ら(2003年)Transplantation, 75:309-315)、ビタミンE(ジェンキンズ(Jenkins)ら(2001年)Transplantation, 71:331-334)、パーフェニドン(シハブ(Shihab)(2002年)Am. J. Transplantation, 2:111-119)、およびアンジオテンシン受容体拮抗薬(ボファ(Boffa)ら(2003年)J. Am. Soc. Nephrol., 14:1132-1144)が挙げられる。しかし、完全に満足できるものはない。

30

40

【0008】

従って、CsAまたは他の免疫抑制剤の腎毒性の低減を可能にする一方、それらの免疫抑制活性を維持する処置モダリティの必要性がある。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

TGF-は、所定の免疫抑制剤の免疫抑制および腎毒性作用の両方を仲介する。この二重の活性のため、本発明より以前は、例えば、抗TGF-抗体などの直接的なTGF-アンタゴニストによる補助療法がこれらの薬剤の腎毒性作用を十分に減少し得、同時

50

にそれらの免疫抑制活性を実質的に妨げないかどうかについては不明であった。

【0010】

本発明は、特に、臓器移植または自己免疫疾患について、免疫抑制剤の腎毒性を低減するための方法および組成物を提供する。従って、方法は、移植片拒絶を防止するかまたは自己免疫疾患を処置するために免疫抑制療法を経験している患者を処置するのに有用である。

【0011】

本発明は、低（高ではない）用量の抗TGF- β 抗体が、同種移植生存率によって判定されるように、CsAの免疫抑制活性を実質的に妨げることなく、CsA仲介腎毒性を軽減することの発見および実証に部分的に基づく。

【0012】

本発明に関連して行われた実験では、心臓移植を施されたCsA免疫抑制ラットに抗TGF- β 抗体を投与した。より低い用量（1mg/kg）の抗TGF- β 抗体で処置されたラットは腎毒性作用の低減を実証した一方、それらの移植片生存率は、CsA単独で処置したコントロールに類似した。同じ条件下で、より高い用量（2.5mg/kg）の抗TGF- β 抗体は、CsAの免疫抑制効果をほぼ完全に撤廃した。

【0013】

従って、本発明は、少なくとも部分的に、TGF- β のアップレギュレーションを介して、それらの免疫抑制活性を仲介する該免疫抑制剤の腎毒性の副作用の緩和のための補助療法を提供する。典型的に、そのような薬剤は、投与時に、TGF- β の発現を誘発する。そのような免疫抑制剤の例として、シクロスポリン、タクロリムス、およびシロリムスが挙げられるが、これらに限定されない。本発明は、そのような薬剤によって誘発される腎炎を処置または防止する方法を提供する。

【0014】

本発明の方法は、免疫抑制剤で処置される免疫抑制を必要とする哺乳動物に、TGF- β アンタゴニストを投与することを含む。TGF- β アンタゴニストは、薬剤の免疫抑制活性を実質的に妨げずに免疫抑制剤の腎毒性作用を緩和するのに十分な治療有効量で投与される。

【0015】

TGF- β アンタゴニストが投与される用量は、免疫抑制剤の腎毒性作用の低減が達成される一方、免疫抑制剤の治療効力を維持するようなものである。典型的に、TGF- β アンタゴニストが投与される用量は、免疫抑制剤の非存在下で腎炎を処置するために投与される推奨用量より（例えば、20%）低い。

【0016】

いくつかの実施態様では、TGF- β アンタゴニストは、例えば、抗TGF- β 抗体、抗TGF- β 受容体抗体、または可溶性TGF- β 受容体などの直接的なTGF- β アンタゴニストである。特定の実施態様では、TGF- β アンタゴニストは、抗TGF- β 抗体1D11、抗TGF- β 抗体CAT192、もしくは抗TGF- β 抗体CAT152、または該抗体のいずれかの誘導体である。非制限的な好適な実施態様では、TGF- β アンタゴニストは、米国仮出願第60/651,343号明細書において開示されているPET1073G12、PET1074B9またはPET1287A10などのヒトpan特異的抗体である。

【0017】

本発明は、免疫抑制剤の腎毒性を検出するための方法ならびに免疫抑制剤の腎毒性作用を低減する能力について試験化合物または組成物を評価するための方法をさらに提供する。そのような方法は、免疫抑制剤で処置した哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、ならびにTGF- β 、NOX-1、p22^{phox}、RAC-1、SOD、およびTRXからなる群から選択される1つもしくはそれ以上の分子の発現レベルを決定することを含んでなる。発現レベルは、免疫抑制剤の腎毒性および/または該腎毒性を低減する際の化合物または組成物の有効性を示す。

10

20

30

40

50

【0018】

配列の簡単な説明

配列番号1～12は、実施例において記載の腎臓における遺伝子発現レベルを評価するために使用されるPCRプライマーを表す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の方法は、免疫抑制剤で処置されている哺乳動物に、TGF-アンタゴニストを投与することを含む。本発明の方法は、免疫抑制剤による処置に関連する腎毒性を低減するが、薬剤の免疫抑制活性を実質的に低減しない。

【0020】

TGF-アンタゴニスト

TGF- は、成熟TGF- を産生するために分泌前に切断される約400アミノ酸(aa)のプレプロタンパク質として合成されるジスルフィド結合ダイマーである。「潜伏関連ペプチド」(LAP)として公知であるN末端切断フラグメントは、ダイマーへの非共有結合を保持し得、それによって、TGF- を不活化する。インビボで単離されたTGF- は、この不活性な「潜伏」形態(即ち、LAPに関連する)において主に見出される。潜伏TGF- 複合体は、いくらかの方法、例えば、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸/インスリン様増殖因子II受容体と呼ばれる細胞表面受容体に結合することによって、不活化され得る。結合は、LAP内のグリコシル化部位に付着したマンノース-6-リン酸残基を介して生じる。受容体に結合する際に、TGF- は、その成熟形態で放出される。次いで、成熟型の活性なTGF- は、自由にその受容体に結合し、その生物学的機能を発揮する。II型TGF- 受容体における主要なTGF- 結合性ドメインは、19アミノ酸配列にマッピングされている(デミートリオウ(Demetriou)ら(1996年)J. Biol. Chem., 271:12755)。

【0021】

本明細書において使用される用語「TGF-」は、任意の1つもしくはそれ以上のアイソフォームのTGF- を指す。同様に、他に明記しない限り、用語「TGF- 受容体」は、少なくとも1つのTGF- アイソフォームに結合する任意の受容体を指す。現在、5つの既知のTGF- のアイソフォーム(TGF- 1~TGF- 5)が存在し、それらのすべてが相互に相同(60~80%同一性)であり、約25kDaのホモダイマーを形成し、共通のTGF- 受容体(TR-I、TR-II、TR-IIB、およびTR-III)に作用する。TGF- 1、TGF- 2、およびTGF- 3は哺乳動物において見出される。TGF- ならびにTGF- 受容体の構造および機能的局面については、当該分野において周知である(例えば、Cytokine Reference、オペンハイム(Oppenheim)ら編、Academic Press San Diego、カリフォルニア州、2001年を参照のこと)。TGF- は、種間で顕著に保存されている。例えば、ラットおよびヒト成熟TGF- 1のアミノ酸配列はほぼ同一である。従って、TGF- のアンタゴニストは、高い種交差反応性を有することが予想される。

【0022】

用語「TGF- アンタゴニスト」ならびに「インヒビター」、「中和する」、および「ダウンレギュレートする」などのその同系用語は、TGF- の生物学的活性のアンタゴニストとして作用する化合物(または該当する場合はその特性)を指す。TGF- アンタゴニストは、例えば、結合して、TGF- の活性を中和する; TGF- 発現レベルを低減する; 安定性または前駆体分子の活性な成熟型への変換に影響を及ぼす; TGF- の1つもしくはそれ以上の受容体への結合を妨げ得; またはそれはTGF- 受容体の細胞内シグナル伝達を妨げ得る。用語「直接的なTGF- アンタゴニスト」は、一般的に、TGF- の生物学的活性を直接ダウンレギュレートする任意の化合物を指す。分子は、それが、TGF- 遺伝子、TGF- 転写物、TGF- リガンド、またはTGF- 受容体を妨げることによって活性をダウンレギュレートする場合、TGF- の生

10

20

30

40

50

物学的活性を「直接ダウンレギュレートする」。

【0023】

TGF- および TGF- アンタゴニストの生物学的活性を中和することを評価するための方法は、当該分野において公知である。より頻繁に使用されるインビトロバイオアッセイのいくつかの例として、以下のものが挙げられる：

(1) EGF の存在下における軟寒天中の NRK 細胞のコロニー形成の誘導 (ロバーツ (Roberts) ら (1981年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 5339 - 5343) ；

(2) 軟骨表現型を発現させるための初代間葉系細胞の分化の誘導 (セイエジン (Seiden) ら (1985年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 267 - 271) ；

(3) Mv1Lu ミルク肺上皮細胞 (ダニエルポール (Danielpour) ら (1989年) J. Cell. Physiol., 138: 79 - 86) および BBC-1 サル腎臓細胞 (ホリー (Holley) ら (1980年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5989 - 5992) の増殖の阻害；

(4) C3H/HeJ マウス胸腺細胞の有糸分裂誘発の阻害 (ラン (Wrann) ら (1987年) EMBO J., 6: 1633 - 1636) ；

(5) ラット L6 筋芽細胞の分化の阻害 (フロリニ (Florini) ら (1986年) J. Biol. Chem., 261: 16509 - 16513) ；

(6) フィブロネクチン産生の測定 (ラナ (Wrana) ら (1992年) Cell, 71: 1003 - 1014) ；

(7) ルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合されたプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター I (PAI-1) プロモーターの誘導 (アベ (Abe) ら (1994年) Anal. Biochem., 216: 276 - 284) ；

(8) サンドイッチ酵素免疫測定法 (ダニエルポール (Danielpour) ら (1989年) Growth Factors, 2: 61 - 71) ；ならびに

(9) シング (Singh) ら (2003年) Bioorg. Med. Chem. Lett., 13(24): 4355 - 4359 に記載の細胞アッセイ。

【0024】

本発明の方法において使用され得る TGF- アンタゴニストの例として：TGF- の1つもしくはそれ以上のアイソフォームに対して指向されたモノクローナルおよびポリクローナル抗体 (米国特許第 5, 571, 714 号明細書；国際公開第 97/13844 号パンフレット；国際公開第 00/66631 号パンフレット；主要なネガティブおよび可能性の TGF- 受容体または TGF- 受容体に対して指向された抗体 (フラベル (Flavel) ら (2002年) Nat. Rev. Immunol., 2(1): 46 - 53) ；米国特許第 5, 693, 607 号明細書；米国特許第 6, 001, 969 号明細書；米国特許第 6, 008, 011 号明細書；米国特許第 6, 010, 872 号明細書；国際公開第 92/00330 号パンフレット；国際公開第 93/09228 号パンフレット；国際公開第 95/10610 号パンフレット；および国際公開第 98/48024 号パンフレット；LAP (国際公開第 91/08291 号パンフレット)；LAP 関連 TGF- (国際公開第 94/09812 号パンフレット)；フェチュインなどの TGF- 結合性糖タンパク質/プロテオグリカン (米国特許第 5, 821, 227 号明細書)；デコリン、パイグリカン、フィブロモデュリン、ルミカン、およびエンドグリン (米国特許第 5, 583, 103 号明細書；米国特許第 5, 654, 270 号明細書；米国特許第 5, 705, 609 号明細書；米国特許第 5, 726, 149 号明細書；米国特許第 5, 824, 655 号明細書；米国特許第 5, 830, 847 号明細書；米国特許第 6, 015, 693 号明細書；国際公開第 91/04748 号パンフレット；国際公開第 91/10727 号パンフレット；国際公開第 93/09800 号パンフレット；および国際公開第 94/10187 号パンフレット)；マンノース-6-リン酸またはマンノース-1-リン酸 (米国特許第 5, 520, 926 号明細書)；プロラクチン (国際公開第 97/4

10

20

30

40

50

0848号パンフレット) ; インスリン様増殖因子II (国際公開第98/17304号パンフレット) ; 植物、真菌、および細菌の抽出物 (EU813875号明細書 ; 特開平8119984号公報 ; および米国特許第5,693,610号明細書) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド (米国特許第5,683,988号明細書 ; 米国特許第5,772,995号明細書 ; 米国特許第5,821,234号明細書 ; 米国特許第5,869,462号明細書 ; および国際公開第94/25588号パンフレット) ; SMADおよびMADを含むTGF-シグナル伝達に關与するタンパク質 (EP874046号明細書 ; 国際公開第97/31020号パンフレット ; 国際公開第97/38729号パンフレット ; 国際公開第98/03663号パンフレット ; 国際公開第98/07735号パンフレット ; 国際公開第98/07849号パンフレット ; 国際公開第98/45467号パンフレット ; 国際公開第98/53068号パンフレット ; 国際公開第98/55512号パンフレット ; 国際公開第98/56913号パンフレット ; 国際公開第98/53830号パンフレット ; 国際公開第99/50296号パンフレット ; 米国特許第5,834,248号明細書 ; 米国特許第5,807,708号明細書 ; および米国特許第5,948,639号明細書) 、スキー (Ski) およびスノ (Sno) (ボーゲル (Vogel) (1999年) Science, 286:665 およびストロシャイン (Stroschein) ら (1999年) Science, 286:771-774) ; ならびにTGF-の生物学的活性を直接阻害する能力を保持する上記で同定される分子の任意の変異体、フラグメント、または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0025】

20

本発明の方法において使用され得るTGF-アンタゴニストの例として：セリン/スレオニンキナーゼインヒビターなどの小分子インヒビター、例えば、WO04/21989 ; WO03/87304 ; WO04/26871 ; WO04/26302 ; WO04/24159、米国特許第6,184,226号明細書 ; WO03/97639 ; およびWO04/16606に記載のものが挙げられる。

【0026】

いくつかの実施態様では、TGF-アンタゴニストは、直接的なTGF-アンタゴニスト、例えば、その受容体に結合するTGF-をブロックする抗体である。

【0027】

本明細書において使用する用語「抗体」は、免疫グロブリンまたはその部分を指し、供給源、産生の方法、および他の特徴にかかわらず、抗原結合部位を含んでなる任意のポリペプチドを包含する。該用語は、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多特異性、ヒト化、ヒト、一本鎖、キメラ、合成、組換え、ハイブリッド、変異、およびCDR移植抗体を含むが、これらに限定されない。用語「抗原結合性ドメイン」は、抗原の部分もしくはすべてに特異的に結合するかまたは相補的である領域を含んでなる抗体分子の部分の部分を指す。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の部分にのみ結合し得る。「エピトープ」、または「抗原決定基」は、抗体の抗原結合性ドメインとの特異的相互作用を担う抗原分子の一部である。抗原結合性ドメインは、抗体軽鎖可変領域(V_L)および抗体重鎖可変領域(V_H)を含んでなり得る。抗原結合性ドメインは、1つもしくはそれ以上の抗体可変ドメイン(例えば、V_HドメインよりなるF_d抗体フラグメント、V_HドメインおよびV_LドメインよりなるF_v抗体フラグメント、またはリンカーによって接続されたV_HドメインおよびV_LドメインよりなるscF_v抗体フラグメント)によって提供され得る。用語「抗TGF-抗体」、または「TGF-の少なくとも1つのアイソフォームに対する抗体」は、TGF-の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する任意の抗体を指す。用語「TGF-受容体抗体」および「TGF-受容体に対する抗体」は、TGF-受容体(例えば、I型、II型、またはIII型)の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する任意の抗体を指す。

30

40

【0028】

本発明の方法において有用な抗体は、それらがTGF-の少なくとも1つのアイソフォームまたは少なくとも1つのTGF-受容体の細胞外ドメインに特異的に結合するよ

50

うなものである。本明細書において使用する用語「特異的相互作用」、もしくは「特異的に結合する」、またはそれらの同系用語は、2つの分子が、生理学的条件下で比較的安定である複合体を形成することを意味する。特異的結合は、高い親和性および低～中等度の能力によって特徴付けられる。非特異的結合は通常、中等度～高い能力を伴う低い親和性を有する。典型的に、結合は、親和定数 K_a が 10^6 M^{-1} より高い、または好ましくは、 10^8 M^{-1} より高い場合、特異的とみなされる。

【0029】

他のいくつかの実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、TGF-β₁、TGF-β₂、および TGF-β₃ からなる群から選択される TGF-β の少なくとも1つのアイソフォームに特異的に結合する。さらに他の実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、少なくとも：(a) TGF-β₁、TGF-β₂、および TGF-β₃ (「pan中和抗体」)；(b) TGF-β₁ および TGF-β₂；(c) TGF-β₁ および TGF-β₃；ならびに (d) TGF-β₂ および TGF-β₃ に特異的に結合する。多様な実施態様では、それが特異的に結合する TGF-β の少なくとも1つのアイソフォームに対する TGF-β 抗体の親和定数 K_a は、好ましくは、 10^6 M^{-1} 、 10^7 M^{-1} 、 10^8 M^{-1} 、 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 、または 10^{12} M^{-1} を超える。さらなる実施態様では、本発明の抗体は、ヒト TGF-β₁、TGF-β₂、および/または TGF-β₃ に実質的に同一なタンパク質に特異的に結合する。また、引用文献に記載の任意の脊椎動物種由来の非ヒト抗体のヒト化および完全なヒト形態ならびに誘導體も、ヒトに使用するために考慮される。そのような変種を産生させることは、当業者内において良好である(例えば、Antibody Engineering、ボレベック(Borrebeck)編、第2版、Oxford University Press、1995年を参照のこと)。

10

20

【0030】

非制限的な例示の実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、ハイブリドーマ 1D11.16 (米国特許第 5,571,714 号明細書；同第 5,772,998 号明細書；および同第 5,783,185 号明細書においても記載の ATCC 寄託番号 HB9849) によって産生されるマウスモノクローナル抗体 1D11 である。1D11 重鎖可変領域の配列は、受託番号 AAB46787 下で入手可能である。従って、関連する実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、1D11 の誘導體、例えば、ヒト化抗体などの AAB46787 におけるそれらに同一の CDR 配列を含んでなる抗体である。さらなる実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、国際公開第 00/66631 号パンフレット、米国特許第 6,492,497 号明細書、ならびに米国特許出願公開番号第 2003/0091566 号明細書および同第 2003/0064069 号明細書に記載の CAT192 および CAT152、または本明細書において開示する CDR 配列を含んでなる抗体などのファージディスプレイによって作製される完全なヒト組換え抗体である。なおさらなる実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、1D11、CAT192、または CAT152 からのガイド選択によって産生される抗体である。

30

【0031】

非制限的な好適な実施態様では、抗 TGF-β 抗体は、米国仮出願第 60/651,343 号明細書において開示されている PET1073G12、PET1074B9 または PET1287A10 などのヒト pan 特異的抗体である。

40

【0032】

1D11 抗体は、TGF-β の3つのすべての哺乳動物アイソフォームに特異的に結合する一方、CAT192 は TGF-β₁ のみに特異的に結合する。1D11 および CAT192 に対する抗原親和性は、それぞれ約 1 nM および 8.4 pM である。1D11 (ダシュ(Dasch)ら(1998年) J. Immunol., 142:1536-1541) および CAT192 に対するエピトープは、成熟 TGF-β の C 末端部分に対してマッピングされている。

【0033】

50

免疫抑制剤

本発明は、少なくとも部分的に、TGF- β のアップレギュレーションを介して、それらの免疫抑制活性を仲介する該免疫抑制剤の腎毒性の副作用の緩和のための補助療法を提供する。本明細書において使用する用語「免疫抑制剤」、「免疫抑制薬」および「免疫抑制薬剤」は、免疫抑制を誘導する化合物または組成物（即ち、それは、免疫学的応答の発達を防止または妨げる）を指す。免疫抑制剤の例として、SandimmuneTM（シクロスポリン）；PrografTM、ProtopicTM（タクロリムス）；RapamuneTM、NeoralTM（シロリムス）；FTY720；CerticanTM（エベロリムス、ラパマイシン誘導体）；CampathTM-1H（アレムツズマブ、抗CD52抗体）；RituxanTM（リツキシマブ、抗CD20抗体）；OKT4；LEA29Y（BMS-224818、CTLA4Ig）；インドリル-ASC（タクロリムスおよびアスコマイシンの32-インドールエーテル誘導体）；ImuranTM（アザチオプリン）；AtgamTM（公共線細胞/グロブリン）；OrthocloneTM（OKT3；ムロモナブ-CD3）；CellceptTM（ミコフェノール酸モフェチル）；ZenapaxTM（ダクリズマブ）、CytosanTM（シクロホスファミド）、プレドニゾン、プレドニゾンならびに他の副腎皮質ステロイドマロノニトリラマイド（MNA（レフルノミド、FK778、FK779））、および15-デオキシスパガリン（DSG）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】

薬剤の免疫抑制活性を評価するための方法は当該分野において公知である。実施例に記載のように、薬理的介入を伴うおよび伴わない移植された臓器のインビボでの生存時間の長さは、免疫応答の抑制に対する定量測定としての役割を果たす。また、インビトロアッセイ、例えば、混合リンパ球反応（MLR）アッセイ（例えば、ファスマン（Fathman）ら（1977年）J. Immunol., 118（4）：1232-1238を参照のこと）；CD3アッセイ（抗CD3抗体（例えば、OKT3）を介する免疫細胞の特異的活性化）（例えば、カンナ（Khanna）ら（1999年）Transplantation, 67（6）：882-889およびカンナ（Khanna）ら（1999年）Transplantation, 67（7）：S58を参照のこと）；ならびにIL-2Rアッセイ（外部から添加したサイトカインIL-2による免疫細胞の特異的活性化）（例えば、ファラー（Farrar）ら、（1981年）J. Immunol., 126（3）：1120-1125を参照のこと）を使用することもできる。

【0035】

本発明は、少なくとも部分的にTGF- β のアップレギュレーションを介してそれらの免疫抑制活性を仲介する腎毒性のある免疫抑制剤による特定の使用に関する。そのような薬剤は、投与時に急性または慢性腎炎を誘発し得る。典型的に、誘発は、薬剤の投与時におけるTGF- β の発現の上昇と相関関係がある。本発明は、そのような薬剤によって誘発される腎炎を処置または防止する方法を提供する。

【0036】

特定の免疫抑制剤がTGF- β のアップレギュレーションを介してその免疫抑制活性を仲介するかどうかは、例えば、実施例に記載のような当該分野において既知の方法を使用して決定することができる。TGF- β のアップレギュレーションを介してそれらの免疫抑制活性を仲介する薬剤の特定の例として、シクロスポリン、タクロリムス、およびシロリムスが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、カンナ（Khanna）（2000年）Transplantation, 70（4）：690-694；カンナ（Khanna）ら（1999年）Transplantation, 67（7）：S84；およびカンナ（Khanna）ら（1999年）Transplantation, 67（6）：882-889を参照のこと）。

【0037】

シクロスポリンA（CAS番号59865-13-3；米国特許第3,737,433号明細書）は、[R-[RR*(E)]]環式（L-アラニル-D-アラニル-N-メチ

10

20

30

40

50

ル - L - ロイシル - N - メチル - L - ロイシル - N - メチル - L - バリル - 3 - ヒドロキシ - N , 4 - ジメチル - L - 2 - アミノ - 6 - オクテノイル - L - アミノ - ブチリル - N - メチルグリシル - N - メチル - L - ロイシル - L - バリル - N - メチル - L - ロイシル)として表される。その免疫抑制効果は、1972年以来公知である(ボレル, J. F. (Borel, J. F.): シクロスポリン: デール(Dale)ら(編): Textbook of Immunology (第3版)、Blackwell Scientific. Publ. Oxford 1994年、320-329頁)。免疫抑制活性を示す他の多くのシクロスポリン系薬剤ならびにそれらの誘導体およびアナログが公知である。シクロスポリン系薬剤およびそれらの処方については、例えば、2004 Physicians' Desk Reference (登録商標)(2003年) Thomson Healthcare、第58版、ならびに米国仮出願第5,766,629号明細書;同第5,827,822号明細書;同第4,220,641号明細書;同第4,639,434号明細書;同第4,289,851号明細書;および同第4,384,996号明細書;同第5,047,396号明細書;同第4,388,307号明細書;同第4,970,076号明細書;および同第4,990,337号明細書;同第4,822,618号明細書;同第4,576,284号明細書;同第5,120,710号明細書;および同第4,894,235号明細書に記載されている。

10

【0038】

タクロリムス(FK506)は、その作用分子様式およびその臨床効力に関して、CsAにかなり類似の効果を発揮するマクロライドである(リュウ(Liu)(1993年) Immunol. Today, 14: 290-295; シュライバー(Schreiber)ら(1992年) Immunol. Today, 13: 136-142)が;しかし、これらの効果は、CsAより20~100倍低い用量で示される(ペータース(Peters)ら(1993年) Drugs, 46: 746-794)。化学的に、タクロリムスは[3S-[3R*[E(1S*, 3S*, 4S*)], 4S*, 5R*, 8S*, 9E, 12R*, 14R*, 15S*, 16R*, 18S*, 19S*, 26aR*]]-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-ヘキサデカヒドロ-5,19-ジヒドロキシ-3-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルエチル]-14,16-ジメトキシ-4,10,12,18-テトラメチル-8-(2-プロペニル)-15,19-エポキシ-3H-ピリド[2,1-c][1,4]オキサアザシクロトリコシン-1,7,20,21(4H,23H)-テトラン-水合物である。タクロリムスおよびその処方については、例えば、2004 Physicians' Desk Reference (登録商標)(2003年) Thomson Healthcare、第58版、ならびに米国特許第4,894,366号明細書;同第4,929,611号明細書;および同第5,164,495号明細書に記載されている。

20

30

【0039】

シロリムス(ラパマイシン)は、例えば、ストレプトマイセス・ヒグロスコピカス(Streptomyces hygroscopicus)より産生可能な免疫抑制性ラクタムマクロライド(immunosuppressive lactam macrolide)である。化学的に、シロリムスは、(3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-ヘキサデカヒドロ-9,27-ジヒドロキシ-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルエチル]-10,21-ジメトキシ-6,8,12,14,20,26-ヘキサメチル-23,27-エポキシ-3H-ピリド[2,1-c][1,4]-オキサアザシクロヘントリ-アコンチン-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-ペントンである。シロリムスの構造は、例えば、ケスラー(Kessler)ら(1993年) Helv. Chim. Acta, 76: 117に付与されている。

40

50

【0040】

シロリムスおよびそのアナログの多数の誘導体ならびにそれらの処方は公知であり、例えば、2004 Physicians' Desk Reference (登録商標) (PDR) (2003年) Thomson Healthcare、第58版、国際公開第94/02136号パンフレット、国際公開第94/09010号パンフレット、国際公開第92/05179号パンフレット、国際公開第93/11130号パンフレット、国際公開第94/02385号パンフレット、国際公開第95/14023号パンフレット、国際公開第94/02136号パンフレットならびに米国特許第5,258,389号明細書；同第5,118,677号明細書；同第5,118,678号明細書；同第5,100,883号明細書；同第5,151,413号明細書；同第5,120,842号明細書；および同第5,256,790号明細書に記載されている。

10

【0041】

使用および投与の方法

本発明の方法は、腎毒性のある免疫抑制剤を伴う哺乳動物に、TGF-アンタゴニストを投与することを含む。

【0042】

本発明の方法に従って処置される哺乳動物として、ヒトおよび他の霊長類、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、およびブタが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0043】

本発明の方法に従って処置される哺乳動物として、免疫抑制を必要とする患者、例えば、自己免疫疾患の患者が挙げられる。本発明の方法に従い得る自己免疫疾患の例として、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病（炎症性腸疾患）、1型糖尿病、重症筋無力症、乾癬、グレーブス病、パーカー病、強皮症、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、自己免疫性溶血性貧血、アジソン病、橋本甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、悪性貧血、および自発不妊 (spontaneous infertility) が挙げられる。

【0044】

本発明の方法に従って処置される哺乳動物として、さらに、免疫抑制を必要とする患者、例えば、免疫抑制療法を経験している臓器または組織移植を伴う患者が挙げられる。「移植」は、任意の移植片もしくは組織または臓器の全体もしくは部分、またはレシピエント（宿主）に対して外来性である細胞を指す。移植の例として、心臓、腎臓、肺、肝臓、角膜、骨髄、血管および島細胞移植が挙げられるが、これらに限定されない。移植は、レシピエントと同じ種（同種移植）由来またはレシピエント以外の種（異種移植）由来のいずれでもあり得る。

30

【0045】

移植患者の免疫抑制管理は、導入期、術後期および移植直後から開始する。導入療法は、促進性および急性拒絶の可能性を低減するために、移植の免疫系を「スイッチオフ」する目的を伴う術直後の約2週間（但し、しばしば、術直前に開始される）の集中的免疫抑制のコースである。次いで、維持療法は、同種移植片の寿命期間継続する。導入および維持戦略は、異なる免疫抑制薬を、特定の用量または至適移植片生存率を提供する治療レベルを達成するために調整された用量で使用することができる。所定の実施態様では、TGF-アンタゴニストは、免疫抑制療法の導入期中、維持期中、またはその両方で、患者に投与される。

40

【0046】

TGF-アンタゴニストは、薬剤の免疫抑制活性を実質的に妨げずに免疫抑制剤の腎毒性作用を緩和するのに十分な治療有効量で投与される。

【0047】

用語「腎毒性効果を緩和するのに十分な」は、免疫抑制剤による腎機能の消失または腎構造の悪化を遅延もしくは反転することを指す。「腎機能」は、腎臓が、加圧ろ過、選択

50

的な再吸収、細尿管分泌、および/または全身血圧調節などのその生理学的機能を達成する能力を指す。

【0048】

腎機能を評価するための方法は当該分野において周知であり、全身血圧および糸球体毛細管圧の測定、タンパク尿（例えば、アルブミン尿（albuminuria））、顕微鏡的および肉眼的血尿（hematuria）、血清中クレアチニンレベル（例えば、ヒトにおける腎機能を評価するための1つの公式は、2.0 mg/dlのクレアチニンレベルを正常腎臓機能の50パーセントに、および4.0 mg/dlを25パーセントに換算する）、糸球体濾過量（GFR）（例えば、クレアチニークリアランスの速度）の低下、ならびに管損傷の程度を含むが、これらに限定されない。

10

【0049】

腎機能および疾患状態の詳細なレビューについては、The Kidney: Physiology and Pathophysiology、セルジン（Seldin）ら編、第3版、Lippincott Williams & Wilkins Publishers、2000年を参照のこと。通常、24時間の期間あたり0.15 g未満のタンパク質が尿中に排泄される。ほぼすべてのタイプの腎臓疾患が、尿への軽度（1日あたり500 mgまで）～中等度（1日あたり4 gまで）のタンパク質漏出を引き起こす。尿におけるアルブミンの正常濃度は、1.0 mg/dl未満である。一般的に、30～300 mg/dlの尿中アルブミンは微量アルブミン尿とみなされ、300 mg/dl以上はマクロアルブミン尿とみなされる。血清中クレアチニンの正常値は、男性では0.6～1.5 mg/dlおよび女性では0.6～1.1 mg/dlである。クレアチニンレベル、腎機能、および腎疾患の病期との間の関係を表1に示す。

20

【0050】

【表1】

表1

クレアチニンレベル(mg/dl)	推定される腎機能の低下	腎疾患の病期
0.6~1.5	25%まで	腎予備力の低下または低減
>1.5	>50%	腎機能不全
4.8	75%	腎不全
10	90%	末期腎疾患

30

【0051】

本発明の方法は、免疫抑制剤の腎毒性に少なくとも部分的に帰すことができる腎機能不全、腎不全、または末期腎疾患を伴う患者において特に有用であり得る。免疫抑制療法を経験している患者において、他の適応症は、97（男性）および88（女性）ml/minより低いクレアチニークリアランスレベル、20～25 mg/dlもしくはそれより高い血中尿素を含み得る。さらに、処置は、微量アルブミン尿、マクロアルブミン尿、および/または24時間の期間あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 gもしくはそれを超えるタンパク尿レベル、ならびに/あるいは約1.0、1.5、2.0、2.5、3、3.5、4.0、4.5、5、5.5、6、7、8、9、10 mg/dlもしくはそれより高い血清中クレアチニンレベルを伴う患者において有用であり得る。

40

【0052】

本発明の方法は、腎機能がコントロール被験体と比べて正常より25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%もしくはそれ以上低い患者における腎疾患の進行を遅延するかまたは反転するために使用することができる。いくつかの実施態様では、本発明の方法は、コントロール被験体と比べて、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%もしくはそれ以上腎機能の消失を遅延する。他の実施態様では、本発明の方法は、コントロール被験体と比べて、少なくと

50

も10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、もしくはそれ以上、患者の血清中クレアチニンレベル、タンパク尿、および/または尿中アルブミン排泄を改善する。腎機能を評価するための非制限的な例示的方法については、本明細書、および例えば、国際公開第01/66140号パンフレットに記載されている。

【0053】

腎構造の悪化を評価する方法もまた周知である。例示的方法を実施例に示す。そのような方法として、腎臓の画像化(例えば、MRI、超音波)、または腎生検の組織学的評価が挙げられる。いくつかの実施態様では、本発明の方法は、例えば、尿細管間質または糸球体損傷の程度ならびに/または腎線維症の程度(例えば、コラーゲンおよびフィブロネクチンの沈着)によって判定されるように、腎構造の悪化を低減する。いくつかの実施態様では、本発明の方法は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%もしくはそれ以上、構造的変化を改善する。

10

【0054】

治療医師は、TGF-アンタゴニストの正確な用量およびレジメンを決定する。一般的に、TGF-アンタゴニストの用量は、アンタゴニストの投与による拒絶の危険性が治療的に許容可能(即ち、それは、免疫抑制薬の免疫抑制活性を実質的に妨げない)以下の量だけ増加されるようなものであるべきである。さらに、用量は、免疫抑制剤の腎毒性効果の低減が治療的に許容可能であるようなものであるべきである。例えば、維持期における拒絶比の5、10、15、20、25、30、40もしくは50%以下の増加は、治療的に許容可能であり得る。

20

【0055】

本発明の方法では、TGF-アンタゴニストは、一般に、免疫抑制剤の非存在下で投与するのに推奨される用量より低い治療有効量で投与される。所定の実施態様では、この用量は、免疫抑制剤の非存在下で腎炎を処置するために推奨される用量より少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、もしくはそれ以上低い。いくつかの実施態様では、TGF-アンタゴニストの治療有効量は、免疫抑制剤の非存在下で投与される最大治療有効量よりも少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、もしくはそれ以上低い。

【0056】

所定の実施態様では、げっ歯類において、例えば、実施例に記載のような条件下で投与される場合、TGF-アンタゴニストは、2、1.9、1.8、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、もしくは1.0mg/kg体重の1D11抗体に等価な用量未満の用量で投与される。治療医師は、TGF-アンタゴニストについて正確な用量およびレジメンならびに補助治療を決定する。開始時点で、抗TGF-抗体、抗TGF-受容体抗体、可溶性TGF-受容体、または別のTGF-アンタゴニストの治療有効量は、0.005~50、0.05~5、または0.5~5mg/kg/dayの範囲であり得る。

30

【0057】

1つの動物において達成される治療有効量は、当該分野において公知の変換因子を使用して、ヒトを含む別の動物に使用するために、変換することができる(例えば、フレイレヒ(Freireich)ら(1966年)Cancer Chemother. Reports, 50(4): 219-244および等価な表面積用量因子に関する表2を参照のこと)。

40

【0058】

【表 2】

表 2

変換先： 変換元：	マウス (20 g)	ラット (150 g)	サル (3.5 kg)	イヌ (8 kg)	ヒト (60 kg)
マウス	1	1/2	1/4	1/6	1/12
ラット	2	1	1/2	1/4	1/7
サル	4	2	1	3/5	1/3
イヌ	6	4	3/5	1	1/2
ヒト	12	7	3	2	1

10

【0059】

「投与」は、任意の特定の処方、送達システム、または経路に限定されず、例えば、非経口（皮下、静脈内、脊髄内、関節内、筋肉内、もしくは腹腔内注入を含む）、直腸、局所、経皮、または経口（例えば、カプセル、懸濁液、もしくは錠剤中）を含んでもよい。個体への投与は、単回用量または反復用量で、ならびに生理学的に許容可能な塩形態および/または許容可能な薬学的キャリアおよび/または薬学的組成物の部分としての添加物を含有する様々な薬学的組成物のいずれかで、生じ得る。生理学的に許容可能な塩形態および標準的な薬学的処方技術ならびに賦形剤は公知である（例えば、Physicians' Desk Reference（登録商標）2003年、第57版、Medical Economics Company、2002年；およびレミングトン（Remington）：The Science and Practice of Pharmacy、ジェナド（Gennado）ら編、第20編、Lippincott, Williams & Wilkins、2000年を参照のこと）。

20

【0060】

アンタゴニストの個体への投与はまた、遺伝子治療によって達成してもよい、ここで、アンタゴニストをコードする核酸配列は、インピボで患者に投与されるか、またはインピトロで細胞に投与され、次いで、患者に導入され、アンタゴニスト（例えば、アンチセンスRNA、可溶性TGF-受容体）が、核酸配列によってコードされる産物の発現によって産生される。TGF-アンタゴニストを送達する遺伝子治療のための方法が説明されている（例えば、ファクライ（Fakhrai）ら（1996）Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 93: 2909-2914を参照のこと）。TGF-アンタゴニストの投与は、例えば、米国特許出願公開番号第2003/0180301号明細書に記載のように、アンタゴニストをコードするcDNA、最も好ましくは、II型TGF-（rsTGFBIIR）またはIII型受容体（rsTGFBIIR）の細胞外ドメインをコードするcDNAを含んでなるベクターを使用する遺伝子導入によって行われる。

30

【0061】

TGF-アンタゴニストおよび免疫抑制剤は、同時に、または重複するかもしくは重複しない間隔で連続的に投与してもよい。連続投与では、TGF-アンタゴニストおよび免疫抑制剤は、任意の順序で投与することができる。アンタゴニストは、唯一活性化化合物としてまたは別の化合物もしくは組成物との組み合わせで投与される。Physicians' Desk Reference（登録商標）に示されるような免疫抑制剤の特定の用量使用してもよい。

40

【0062】

本発明は、免疫抑制を必要とし、免疫抑制のための薬剤が投与されている哺乳動物において免疫抑制剤（例えば、CsA、TAC、ラバマイシン、または別の免疫抑制剤）の腎毒性を検出するための方法をさらに提供する。方法は、哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、ならびにTGF-、NOX-1、p22^{phox}、RAC-1、SOD、お

50

よび T R X からなる群から選択される 1 つもしくはそれ以上の分子の発現レベルを決定することを含んでなる。本発明は、免疫抑制を必要とし、免疫抑制のための薬剤が投与されている哺乳動物において免疫抑制剤（例えば、C s A、T A C、ラパマイシン、または別の免疫抑制剤）の腎毒性を検出するための方法をさらに提供する。

【0063】

本発明は、免疫抑制剤の腎毒性作用を低減する能力について、試験化合物または組成物（例えば、抗 T G F - 抗体などの T G F - アンタゴニスト）を評価するための方法をなおさらに提供する。これらの方法は、免疫抑制剤および目的の試験化合物または組成物の両方が投与されている哺乳動物から生物学的サンプルを得ること、および T G F - 、 N O X - 1、p 2 2 ^{p h o x}、R A C - 1、S O D、および T R X からなる群から選択される 1 つもしくはそれ以上の分子（1、2、3、4、5、もしくは 6 種すべて）の発現レベルを決定することを含んでなる。

10

【0064】

適切なコントロールを超える発現レベルは、免疫抑制剤の腎毒性および/または該腎毒性を低減する際の化合物または組成物の有効性を示す。例えば、適切なコントロールから 20、30、40、もしくは 5 パーセント、または少なくとも 2、4、5、もしくは 10 倍だけ異なる発現レベルは、薬剤が腎毒性を誘発しているおよび/または試験化合物もしくは組成物が該腎毒性を低減するのに有効であることを示す。発現レベルは、例えば、任意の適切な方法によって、タンパク質および/または m R N A レベルで決定することができる。

20

【0065】

得られる生物学的サンプルは、例えば、組織サンプル（例えば、いくつかの実施態様における腎臓生検）、血液、または血清であり得る。

【0066】

以下の実施例は、本発明の例示的实施態様を提供する。当業者は、本発明の精神または範囲を変更することなく、実施され得る多数の改変および変種を認識する。そのような改変および変種は、本発明の範囲内に包含される。実施例は、いかなる方法においても本発明を制限しない。

【実施例】

【0067】

材料および方法（第 1 部）

以下の材料および方法を実施例 1 および 2 において使用した。

30

【0068】

実験群

ラットを、以下を含む 6 群（それぞれにおいて n = 6）に分けた：

- (1) 非処置コントロール；
- (2) 2 . 5 m g / k g C s A ；
- (3) 2 . 5 m g / k g C s A + 2 . 5 m g / k g コントロール抗体；
- (4) 2 . 5 m g / k g C s A + 2 . 5 m g / k g 抗 T G F - 抗体；
- (5) 2 . 5 m g / k g C s A + 1 . 0 m g / k g 抗 T G F - 抗体；および
- (6) 同系移植コントロール；

40

【0069】

実験期間中、移植日に開始して、2 . 5 m g / k g（筋肉内）の用量で C s A を使用することによって、免疫抑制を達成した。屠殺時または臓器拒絶まで、3 日ごとの腹腔内注入によって、抗 T G F - 抗体またはコントロール抗体を投与した。

【0070】

調製および移植

ハウセンパド（Hosenpud）ら（2000年）Transplantation, 69: 2173 - 2178 に記載のように、研究集団全体に対して異所性心移植を実施した。ドナーラットをヘパリン処置（1000 単位、腹腔内）し、ペントバルビタールナ

50

トリウム (50 mg / kg、腹腔内) で麻酔した。腹部切開を行って、胸腔から拡げ、胸壁を取り出した。心臓、大動脈、および肺動脈の鈍的切開を実施した。肺静脈および下大静脈を結紮し、移植片を摘出して、氷冷した生理食塩水中に置いた。次いで、レシピエントラットを、ペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg、腹腔内) で麻酔した。正中開腹を実施した。腹部大動脈および大静脈を解剖し、ストレート型血管鉗子でクランプして出血を防止した。長さ約 5 mm の大動脈および静脈の縦切開を実施した。8 - 0 プロリン縫合系による標準的な微小血管技術を使用して、大動脈から腹部大動脈および肺動脈から下大静脈への端側吻合を行った。止血を達成し、切開部を 3 - 0 VicrylTM 縫合系で閉鎖した。

【0071】

動物のモニタリング、屠殺、組織回収

同種移植片の低速化および不全の証拠についてラットを連日モニターした。次いで、それらを、ペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg、腹腔内) で麻酔した。動物を、生来の心室穿刺を介して放血させた。血漿サンプルを、ELISA キット (Promega, Madison、ウィスコンシン州) を使用して、TGF - タンパク質についてアッセイした。両方の腎臓を入手した (一方は遺伝子発現用として、一方は組織学および免疫組織学用として)。

【0072】

免疫抑制プロトコル

適切な群において CsA を使用して、免疫抑制を達成した。CsA は、抗 TGF - 抗体 (1D11) またはコントロール抗体を伴うおよび伴わない研究の期間中、2.5 mg / kg の用量で使用した。屠殺時または臓器拒絶まで、3 日ごとの腹腔内注入によって、抗 TGF - 抗体またはコントロール抗体の処置を投与した。

【0073】

コントロール抗体 (13C4) はまた、赤痢菌 (Shigella) 毒素に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体 (IgG1) である。両抗体を産生させ、Genzyme Corporation で精製した。抗体は、検出可能な内毒素を含まないことが決定された。

【0074】

ラット血漿における TGF - タンパク質の測定

TGF - 1 タンパク質を、(カンナ (Khanna) ら (1999 年) Transplantation, 67: 882 - 889) に先に記載されているように測定した。ラットから血漿を分離し、-70 で貯蔵した。TGF - 1 タンパク質を、酸活性化したサンプルに対し、市販の TGF - 1 特異的キット (Promega, Madison、ウィスコンシン州) を使用するサンドイッチ ELISA によって、アッセイした。

【0075】

TGF - 1 についての病理組織学および免疫組織化学

各動物由来の 1 つの腎臓をホルマリン中に固定化し、パラフィン包埋した。ヘマトキシリンおよびエオシンならびにマッソントリクローム染色を使用して、組織学的変化を評価した。TGF - を、標準的な免疫組織化学的方法 (カンナ (Khanna) ら (1999 年) Transplantation, 67: 882 - 889) を使用して、同定した。ホルマリン固定化、パラフィン包埋された組織を、5 μm で切片化し、キシレン中で脱パラフィンし、PBS に対し段階別に調製したエタノール中で再水和した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、メタノール / 過氧化物 (18: 1 vol / vol) で 30 分間ブロックした後、非特異的結合を、10% 正常ウマ血清、および 3% BSA を補充した PBS 中に希釈した 1.5% アビジン / ビオチンで 1 時間、ブロックした。次いで、組織切片を、1 晩、4 で、上記の PBS 中 1D11 mAb (50 mg / ml) と共にインキュベートした。PBS による複数回の洗浄後、スライドを、1 時間、1: 1000 希釈ビオチン標識抗マウス IgG ウマ抗血清と共に、室温でインキュベートし、再度、PBS 中で広範に洗浄し、次いで、ABC 溶液中で 30 分間洗浄した。次いで、スライドを、10 分間、ジ

10

20

30

40

50

アミノベンジジン (DAB) 中で展開し、水で10分間、濯いだ。次いで、スライドを、ヘマトキシリンで対比染色し、続いて、段階的に調製したエタノールおよびキシレン中で脱水した。スライドを、評価のために、PermountTMでマウントした。各群由来のサンプルを、病理組織学的変化および免疫組織化学染色のために等級付けした。免疫染色の強度を、0 (非染色) ~ 4+ (最大染色) に等級付けした。

【0076】

腎臓組織における逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による mRNA の検出

SV TotalTM RNA 単離 System (Promega Madison、米国) を使用して、ラット由来の腎臓組織の薄片から全 RNA を単離し、RNA の質を 260/280 nm 比によって確認した。1 マイクログラムの RNA を、RT-PCR のための Superscript First Strand SynthesisTM システム (Life Technologies Rockville、メリーランド州、米国) を使用して、cDNA に逆転写した。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅を、1 μl の cDNA、ならびに 2 μl のそれぞれの 2.5 mM コーディングおよび非コーディングオリゴヌクレオチドプライマーならびに Platinum PCR SupermixTM (Life Technologies, Rockville、メリーランド州、米国) を使用して、行った。使用したプライマー配列および対応する参考文献は以下に列挙したとおりである。

【0077】

1) TGF- 1 (チエン (Qian) ら (1990年) Nucleic Acid Res., 18:3059)

コーディング: ACG CCT GAG TGG CTG TCT TTT (配列番号 1)

非コーディング: ACG TGG AGT TTG TTA TCT TTG (配列番号 2)

2) - アクチン (ポンテ (Ponte) ら (1984年) Nucleic Acids Res., 12:1687)

コーディング: GAT CTG GCA CCA CAC CTT CTA (配列番号 3)

非コーディング: GCA GGA TGG CGT GAG GGA GAG (配列番号 4)

3) コラーゲン I (フランケル (Frankel) ら (1988年) DNA, 7:347-354)

コーディング: CCC ACG TAG GTG TCC TAA AGT (配列番号 5)

非コーディング: CCG TGG TGC TAA AAT AAT AAA (配列番号 6)

4) フィブロネクチン (シュバルツバウアー (Schwarzbauer) (1987年) EMBO J., 6:2573-2580)

コーディング: ATG ATG AGG TGC ACG TGT GT (配列番号 7)

非コーディング: GAT GGG GTC ACA TTT CCA TC (配列番号 8)

5) MMP-2 (ポロック (Pollack) ら (1995年) J. Biol. Chem., 270:18786-18796)

コーディング: GTG CTG AAG GAC ACA CTA AA (配列番号 9)

非コーディング: TTG CCA TCC TTC TTT TCA AA (配列番号 10)

6) TIMP-2 (バッタリア (Battaglia) ら (1994年) Exp. Cell

10

20

30

40

50

1 Res., 213:398-403)

コーディング: A A A C G A C A C T T A T G G C A A A C (配列番号
11)

非コーディング: A C A G G A A G C G T C A C T T C T C T (配列番号
12)

【0078】

このような遺伝子の発現の半定量的評価のために、各プライマー対についてサイクル分析を実施し、至適増幅のサイクル数を決定した。PCR産物を、1%アガロースゲル電気泳動において分離した。エチジウムブロマイド染色した特定のバンドをUV光下で可視化し、写真撮影した。特定のバンドのデンストメトリー分析を、Alpha-ImagerTM (Alpha Innotech Corp., San Leandro、カリフォルニア州、米国)を使用して行い、データを、 β -アクチンに対する特定の遺伝子の比として表す。

10

【0079】

データ解析

報告されたデータを平均 \pm SEMとして表す。次いで、適切な群間の差異を、分散分析を使用して解析した。

【0080】

実施例1: CsAの免疫抑制効果に対する抗TGF- β 抗体の効果

これらの研究において使用したWF(RT1^u)からLEW(RT1^l)への完全な不一致株に組み合わせを用いるラット異所性心移植モデルは、拒絶を防止するための長期免疫抑制を必要とする。TGF- β 中和抗体またはアイソタイプ一致コントロール抗体を投与して、TGF- β 発現が、最初の30日以内のCsA処置動物の同種移植片生存率に影響を及ぼすかどうかを決定した。

20

【0081】

非処置動物由来の移植片は、移植の平均11日後に拒絶した($n=6$ 、 11 ± 1.5)。対照的に、CsA処置動物由来の移植片は、平均で117日間、生存した($n=6$ 、 117 ± 9 、 $p < 0.001$)。慢性拒絶の病因におけるTGF- β の役割をより良好に理解するため、心臓移植レシピエントに、移植3日後に開始して、週3回、1.0または2.5mg/kgの抗TGF- β 抗体を投与した。コントロール抗体を、同一濃度および投与スケジュールで投与した。非処置同種移植片と、CsA+2.5mg/kg抗TGF- β 抗体で処置した群との間で、生存率の統計的有意差は観察されず、 12.7 ± 1.2 日の平均生存時間を有した(図1)。CsA+2.5mg/kgコントロール抗体は拒絶しなかったが、組織学的変化の比較の目的のために、CsA+抗TGF- β 抗体処置動物と類似の日数で屠殺した。

30

【0082】

全く対照的に、1.0mg/kgの抗体を注入した動物は、CsA+2.5mg/kgの抗TGF- β 抗体を受容した動物と同様に拒絶せず、平均生存時間は 99 ± 8 日であった。これは、より高い抗体群と比較して高度に有意であった($p < 0.01$)。この時点でのデータは、2.5mg/kgの濃度での抗TGF- β はCsAの効力を全廃するため、CsAの免疫抑制効果がTGF- β によって仲介されるという仮説を強く支持する。現在のデータは、おそらく、TGF- β の線維形成特性が抗TGF- β 抗体によって中和されたため、より低い用量の抗TGF- β 抗体を注入したラットはより低い重症度の腎病理学的変化を有したことを実証する。

40

【0083】

実施例2: CsAの腎毒性作用に対する抗TGF- β 抗体の効果

これらの実験は、CsAの腎毒性作用におけるTGF- β の役割を研究するために実施した。CsAと共に、レシピエントを、拒絶時まで、1週間に3回、TGF- β またはコントロール抗体(1.0mg/kg)でも処置した。群には次のものが含まれた: 非処置同種移植; CsA処置同種移植; CsA+コントロール抗体(1.0mg/kg)処置同

50

種移植およびCsA + 抗TGF-β抗体 (1.0 mg / Kg)、処置されたおよびアイソタイプコントロール。

【0084】

腎機能

研究したすべての実験動物から屠殺後に得られるラットの血漿におけるクレアチニンおよび血中尿素窒素 (BUN) レベルを定量化することによって、腎機能を測定した。定量化は、Sigma (St. Louis、米国) 製のキットを使用して実施した。BUNレベルは、CsA 処置動物において、同系移植コントロールと対比して上昇し (18.6 ± 0.85 対 12.6 ± 0.4 mg / dl ; $p < 0.0001$)、CsA + 抗TGF-β抗体処置した動物 (13.8 ± 0.63 、 $p < 0.03$) においてレベルの低減が観察されたが、CsA + コントロール処置した動物 (17.8 ± 0.45) では認められなかった。血清クレアチニンの有意な増加 (0.75 ± 0.03 対 0.43 ± 0.2 mg / dl ; $p < 0.0001$) が同系移植と比較してCsA 処置レシピエントに観察された。BUNレベルと同様に、CsA + 抗TGF-β抗体で処置した動物 (0.49 ± 0.06 、 $p < 0.003$) はクレアチニンレベルの低減を示したが、コントロール抗体 (0.68 ± 0.08) では示さなかった。

10

【0085】

TGF-β₁、コラーゲン、およびフィブロネクチン mRNA の腎内発現

(遺伝子ノックアウト - アクチン比、それぞれ $n = 6$) として表される結果 (図2) は、TGF-β₁、コラーゲンおよびフィブロネクチンの腎内 mRNA 発現に対する抗TGF-β₁ またはコントロール抗体を伴うおよび伴わないCsAの長期処置の効果を実証する。

20

【0086】

TGF-β₁

CsAの長期処置は、同系移植と比較して、TGF-β₁ mRNAの腎内発現の増加 ($p < 0.01$) を生じた。同系移植およびCsA抗TGF-β₁抗体 (1.0 mg / kg) で処置したレシピエント間においてTGF-β₁ mRNA発現の差異 ($p = 0.12$) は認められなかった一方; CsAおよびCsA + 抗TGF-β₁抗体 (2.5 mg / kg) 処置レシピエント間においては有意差 ($p < 0.003$) が観察された。CsAおよびCsA + コントロール抗体処置レシピエント間では差異が観察されなかった。

30

【0087】

コラーゲン

CsAの長期処置は、同系移植と比較して、コラーゲン mRNAの腎内発現の増加 ($p < 0.0001$) を生じた。CsAおよびCsA + 抗TGF-β₁抗体処置レシピエント間では、有意差 ($p < 0.008$) が観察された (図2)。CsAおよびCsA + コントロール抗体処置レシピエント間では差異が観察されなかった。

【0088】

フィブロネクチン

類似の結果が、フィブロネクチン mRNA で得られ (図2)、CsAの長期処置は、同系移植と比較して、フィブロネクチン mRNAの腎内発現の増加を生じた ($p < 0.0001$)。CsAおよびCsA + 抗TGF-β₁抗体処置レシピエント間では、有意差 ($p < 0.002$) が観察された。CsAおよびCsA + コントロール抗体処置レシピエント間では差異が観察されなかった。

40

【0089】

MMP-2およびTIMP-2の腎内発現

結果 (図3) は、CsAの長期処置は、同系移植と比較して、MMP-2 mRNAの腎内発現の増加 ($p < 0.0002$) を生じたことを実証する。CsAおよびCsA + 抗TGF-β₁抗体処置レシピエント間では、有意差 ($p < 0.004$) が観察された。CsAおよびCsA + コントロール抗体処置レシピエント間では差異が観察されなかった。抗TGF-β₁抗体処置レシピエントは、TIMP-2 mRNAの腎内発現の低減を実証したが、統計的に有意な差異ではなかった。CsAおよびCsA + コントロール抗体処置レシ

50

エント間では差異が観察されなかった。

【0090】

TGF-タンパク質の循環レベルに対する抗TGF-抗体の効果

これらの結果(図4)は、同系移植と比較して、CsAの長期処置がTGF-タンパク質の循環レベルの有意な($p < 0.0001$)増加を生じたことを実証する。同系移植およびCsA+コントロール抗体処置レシピエント間ではTGF-レベルの差異は認められなかった;しかし、CsAおよびCsA+抗TGF-抗体処置レシピエント間では統計的に有意な差異($p < 0.003$)が観察された。

【0091】

TGF-タンパク質の腎内発現に対する抗TGF-抗体の効果

腎内TGF-タンパク質発現の有意に高い(3+ - 4+)染色がCsA処置レシピエントにおいて観察されたが、これは、コントロール抗体+CsAで処置した群において異ならなかった。CsA+抗TGF-抗体(1.0mg/kg)で処置した動物におけるTGF-タンパク質染色は減少したが、同系移植コントロールより若干高い状態を保持した。

【0092】

腎組織学に対する抗TGF-抗体の効果

CsAによる処置は、CsAによる長期処置を受容している患者に類似の病理組織学的変化を生じた。I)CsA単独;II)CsA+コントロール抗体;およびIII)CsA+抗TGF-抗体(1.0mg/kg)で処置した心移植レシピエントラットの腎組織由来のPASおよびH&E染色スライドの病理組織学的分析を実施した。管構造のPAS染色の増加を含む管空胞化および脈管変化が、CsAおよびCsA+コントロール抗体処置動物において見出された。群IIIのすべての動物が完全に正常な腎組織学を有したわけではないが、変化は、時折しか観察されず、この群において顕著ではなかった。PAS染色もまた、抗TGF-処置レシピエントにおいて減少した。結果は、CsAおよびCsA+コントロール抗体処置動物における基底膜の肥厚および空胞化を含む管および脈管変化を実証する。

【0093】

材料および方法(第2部)

以下の材料および方法を実施例3~9において使用した。

【0094】

実験群

Lewis(LEW RT1¹)ラットを以下の5群に分けた:

- (1) 非処置同種移植コントロール;
- (2) 非処置同系移植コントロール;
- (3) TAC;
- (4) TAC+抗TGF-抗体;および
- (5) TAC+コントロール抗体。

【0095】

TACを、0.25mg/kgで筋肉内に90日間投与し;抗TGF-抗体、1D11を、1mg/kgで週2回投与した。使用したコントロール抗体は13C4であった。

【0096】

ラット腎移植

LEW RT1¹またはWistar-Furth WF RT1^uドナーの腎臓を、それぞれ、同系および同種移植のために、LEW RT1¹レシピエントに移植した。(LEW RT1¹およびWF RT1^u)ラットは、主要およびマイナー組織適合性遺伝子座の両方において完全な遺伝子不均衡を示す。)

【0097】

移植は、以下のとおりに行った。50mg/kgペントバルビタール(腹腔内)による全身麻酔の導入後に、腎臓ドナーに対して正中開腹を実施した。左腎臓をその血管茎に対

10

20

30

40

50

して動員し、尿管を分割した。ヘパリン処置（1,000 U、腹腔内）後、豊富な周囲大動脈および大静脈を伴う左腎臓を取り出した。次いで、腎臓に氷冷蔵塩水を軽く流し、移植するまで貯蔵した。レシピエント（上記のように麻酔した）では、正中開腹を介して、下大動脈および静脈を暴露した。標準的な微小血管外科技術を使用して、左ドナー腎臓を、端側形式でレシピエントの管に吻合し、血流を回復させた。尿管を膀胱壁に挿入し、短いセグメントのPE50管でステントした。

【0098】

動物のモニタリング、屠殺、組織回収

代謝ゲージに収容したラットを移植片拒絶の証拠について毎日モニターした（即ち、有意な重量増加および尿量の減少）。腎機能を、血清中クレアチニンおよびBUNレベルの変化によって決定した。拒絶の時点または観察期間の終了時に、動物をペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg、腹腔内）で麻酔した。心臓穿刺を介する放血後、同系移植および同種移植を、以下に記載の日常的な組織学、免疫組織化学、ウエスタンブロッティング、およびRT-PCRを使用して、分析した。

【0099】

BUNおよびクレアチニンレベル

腎機能を評価するために、それぞれWako Chemicals, Richmond、バージニア州およびOxford Biomedical Research, Oxford、ミシガン州由来の市販のキットを使用して、血清中BUNおよびクレアチニンを分析した。

【0100】

同種移植片の組織学、免疫組織化学および病理組織学的変化の定量化

各動物由来の移植した腎臓の一部をホルマリンで固定化し、パラフィン中に包埋した。ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）ならびに過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を使用して、組織学的変化を評価した。腎臓の組織学的変化については、本発明者らは、標準的な手順によって定量化した。糸球体障害の重症度を、カンナ（Khanna）ら（2000年）Transplantation, 73:1543-1549に記載のようにスコア評価した。簡単に説明すると、各領域において、少なくとも50~60個の糸球体を各標本について計数し、病変を、5ポイントスケール（0、増殖なし、ほとんど正常な組織学；1、約25%のセグメント状病巣；2、25%を超えるが50%を超えないセグメント病巣；3、広汎な増殖を伴う繊維化病巣；4、ほとんど完全な繊維化変化）に対してスコア評価した。PAS染色を使用して、細胞外マトリックスタンパク質蓄積の程度を決定した（スコア評価せず）。H&E染色スライドにおける小葉間動脈および病巣をスコア評価した。

【0101】

血漿中TGF- β タンパク質および腎臓組織における免疫化学

TGF- β タンパク質の血漿中レベルを、カンナ（Khanna）ら（1999年）Transplantation, 67:882-889に記載されているように測定した。TGF- β の腎内タンパク質発現を、カンナ（Khanna）ら（2000年）Transplantation, 73:1543-1549；カンナ（Khanna）ら（2002年）Kidney Intl., 62:2257-63；およびカンナ（Khanna）ら（1999年）Transplantation, 67:614-619に本質的に記載のように、免疫組織化学的に調べた。ホルマリン固定化パラフィン包埋された組織を、細かい切片にスライスし、キシレン中で脱パラフィンし、リン酸緩衝化食塩水（PBS）に対し段階別に調製したエタノール中で再水和した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、メタノール/H₂O₂（18:1 vol/vol）で30分間ブロックした後、非特異的結合を、10%正常ウマ血清および3%BSAを補充したPBS中に希釈した1.5%アビジン/ビオチンで1時間、ブロックした。組織切片を、1晩、4℃で、上記のPBS中の特異的第一抗体（50 μ g/ml）と共にインキュベートした。PBS中での広範な洗浄後、スライドを、室温で、1時間、希釈した（1:1,000）ビオチン標識抗マ

10

20

30

40

50

ウスIgGウマ抗血清と共にインキュベートし、PBS中で再度広範に洗浄し、次いで、ABC溶液中で30分間洗浄した。スライドを、10分間、ジアミノベンジジン(DAB)中で展開し、水で10分間、濯いだ。次いで、スライドを、ヘマトキシリンで対比染色し、段階的に調製したエタノールおよびキシレン中で脱水した。

【0102】

スライドを、評価のために、PermountTMでマウントした。各群由来のサンプルを、病理組織学的変化および免疫組織化学染色のために等級付けした。免疫染色の強度を、0(非染色)~4+(最大染色)に等級付けした。各動物についての腎臓組織化学の重症度を、次のパラメータ：間質の線維化、動脈変化、および糸球体硬化症のそれぞれについて2名の個体によって盲検的に等級付けした。

10

【0103】

リアルタイムPCRによるmRNAの検出

RT-PCRを、Bio-Rad iCyclerTMシステム(Bio-Rad, Hercules、カリフォルニア州)を使用して実施した。Promega(Madison、ニュージャージー州)製キットを使用して腎臓からRNAを単離し、Invitrogen(Carlsbad、カリフォルニア州)製cDNA合成キットを使用してcDNAに逆転写した。プライマーの特異性を、95℃で20秒間および60℃で1分間の40サイクルの正規のPCRを稼動し、続いて、エチジウムブロマイド含有アガロースゲルにおいて分離することによって、試験した。リアルタイムPCRを、SYBR Supermixキット(Bio-RAD)(95℃で20秒間および60℃で1分間の40サイクル)を使用して、実施した。PCR効率は、テンプレートcDNAを連続的に希釈することによって調べた。融解曲線データを回収して、PCR特異性を確認し、各アッセイに適切なネガティブコントロールを含めた。各サンプルの各遺伝子についてのmRNAレベルを、 β -アクチンmRNAに対して正規化し、カナ(Khanna)ら(2005年)Nephron Exp. Nephrol., 101:119-126に記載のように2[(Ct/ β -アクチン-Ct/目的の遺伝子)]として提示した。

20

【0104】

ウエスタンブロッティング

凍結組織を、1%トリトン(Triton)X-100、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、35ng/mlペプスタチンAおよび10ng/mlロイペプチンを伴う氷冷PBSにおいて均質化した。遠心分離後、50 μ gのタンパク質を、カナ(Khanna)ら(2005年)Nephron Exp. Nephrol., 101:119-126に記載のようにSDS PAGEによって遠心分離した。プロットを、適切な希釈のポリクローナル抗p22phox抗体(R5554、Marsh Lab, Bozeman、モンタナ州より贈与)または抗NOX抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz、カリフォルニア州)でプロービングし、1:5,000希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ-コンジュゲート第二抗体と共にインキュベートし、増強された化学発光によって可視化した。

30

【0105】

統計解析

ANOVAおよびスチューデントのt検定を使用して、TGF- β の遺伝子発現および血漿レベルについての群の平均間の差異を評価した。GraphPad, San Diego、カリフォルニア州製の統計ソフトウェアプログラムを使用して、解析を実施した。結果を平均 \pm SEMで表し、両側検定の有意水準を、 $p < 0.05$ のレベルで決定した。

40

【0106】

実施例3：腎臓機能に対するTACの影響を低減する抗TGF- β 抗体

BUNレベル(図5A)は、90日間の処置後のTAC処置ラットにおいて、移植90日後に回収した同系移植コントロールと対比して上昇した(29.9 \pm 1.3対17.3 \pm 1.3mg/dl; $p < 0.0001$)。抗TGF- β 抗体(21.3 \pm 0.9、 $p < 0.01$)はBUNレベルを減少させたが、コントロール抗体(26.6 \pm 1.1mg/

50

d l) は減少させなかった。同様に、T A C 処置レシピエントでは、同時に行われた同系移植コントロールと比較して、血清中クレアチニンの有意な増加 (0.83 ± 0.06 対 0.52 ± 0.09 mg / d l ; $p < 0.04$) が観察された。B U N レベルと同様に、抗 T G F - 抗体 (0.48 ± 0.08 mg / d l ; $p < 0.02$) は T A C 誘導性クレアチニンレベルを阻害したが、コントロール抗体 (0.78 ± 0.09) は阻害しなかった (図 5 B)。

【 0 1 0 7 】

実施例 4 : T G F - 、 N O X - 1、p 2 2 ^{p h o x} ならびに R A C - 1 m R N A の抗 T G F - 抗体および T A C 誘導性腎内発現

移植 90 日後の (1) 同系移植、(2) T A C、(3) T A C + 抗 T G F - 抗体、および (3) T A C + コントロール抗体処置動物由来の腎臓組織における T G F - 、N O X - 1 および p 2 2 ^{p h o x} の腎内発現を、R T - P C R によって分析した。T A C による処置は、T G F - (37 倍)、N O X - 1 (18 倍)、および p 2 2 ^{p h o x} (31 倍)、および R A C - 1 (20 倍) の m R N A 発現を増加した。遺伝子発現の増加は、抗 T G F - 抗体 (それぞれ、 $p < 0.01$; $p < 0.008$ 、 $p < 0.04$ 、および $p < 0.03$) によって減少したが、コントロール抗体では減少しなかった (図 6)。同系移植コントロールに関する結果を提示する。

10

【 0 1 0 8 】

実施例 5 : T G F - 、S O D および T R X の特異な腎内 m R N A 発現

T A C による長期処置の抗酸化遺伝子に対する効果についてさらに調べるために、S O D および T R X の腎内 m R N A 発現を決定した。データは、S O D および T R X m R N A が減少した一方、同系移植コントロールと比較して、T A C 処置ラットでは T G F - m R N A が増加したことを実証した (図 7)。T A C による処置は、T G F - m R N A の 37 倍の増加生じた一方、S O D および T R X の m R N A 発現は、それぞれ 27 および 80 倍減少した。S O D m R N A は、抗 T G F - 抗体を部分的に反転する一方、T R X m R N A は、完全に反転された。

20

【 0 1 0 9 】

実施例 6 : p 2 2 ^{p h o x} および N O X - 1 タンパク質の移植片内発現

同系移植、非処置同種移植、および T A C によって処置された動物由来の腎臓組織において、p 2 2 ^{p h o x} および N O X - 1 タンパク質の発現を分析した。タンパク質溶解物 (10 μ g) を電気泳動し、ニトロセルロース紙に移し、抗 p 2 2 ^{p h o x} および抗 N O X - 1 抗体でプロービングした。図 8 に示されるように、T A C による処置は、p 2 2 ^{p h o x} および N O X - 1 の移植片内 (i n t r a g r a f t) 発現の増加を生じた。

30

【 0 1 1 0 】

実施例 7 : T A C による処置は、腎移植における腎毒性特異的組織学的変化を生じる。

H & E および P A S 染色腎臓薄切片における病理組織学的試験によって、形態学的変化に対する T A C、T A C + コントロール抗体および T A C + 抗 T G F - 抗体処置の効果の評価した。

【 0 1 1 1 】

コントロールラットの腎臓 (同系移植) の光学顕微鏡的所見は、正常な糸球体、輸入細動脈および細管細胞を示した。全く対照的に、T A C を受容したラットの腎臓組織は、重度 ~ 中等度の尖端突起の形成 (e p i c a l b l e b b i n g)、硝子化、糸球体基底膜肥厚、尿細管間質の線維化のパターンならびに輸入細動脈および小葉間動脈の末端部分の細動脈病変を含む顕著な組織学的変化を示した。これらの変化は、T A C および抗 T G F - 抗体の同時投与では観察されなかった。しかし、類似の変化が、T A C + コントロール抗体で処置した動物において認められた。P A S 染色切片もまた、抗 T G F - 抗体処置レシピエントにおいて、ほぼ正常と比較して、基底膜の肥厚を示す。抗 T G F - 抗体による T A C 誘導性変化の反転が観察された。T A C + コントロール抗体処置動物における組織学は、T A C 単独のそれと異ならなかった。硝子化および細動脈病変尿細管間質の線維化および糸球体基底膜肥厚が、T A C および T A C + コントロール抗体処置レシピ

40

50

エントにおいて観察されたが、TAC + 抗TGF- β 抗体処置レシピエントでは観察されなかった。腎毒性に特異的な近位尿細管上皮細胞特異的变化が、TACおよびTAC + コントロール抗体処置ラット移植レシピエントにおいて認められ、同系移植またはTAC + 抗TGF- β 抗体処置ラットでは認められなかった。定量分析は、TAC + 抗TGF- β 抗体処置同種移植と統計的に異ならない同系移植と比較して、TAC処置レシピエントでは統計的有意 ($p < 0.036$) 差を実証した。

【0112】

実施例8：TACはTGF- β の腎内発現を増加する。

免疫組織化学を使用して、TAC、TAC + 抗TGF- β 抗体、TAC + コントロール抗体処置または非処置同種移植で処置した腎臓移植のレシピエント由来の腎臓組織におけるTGF- β タンパク質の腎内発現について分析した。腎臓切片を、カナ (Khanan) ら (2004年) *Circulation*, 110:3822-3829に記載のように抗TGF- β 抗体で染色した。TACおよびTAC + コントロール抗体処置レシピエントでは、硝子化および細動脈病変尿細管間質の線維化および糸球体基底膜肥厚の他に、TGF- β タンパク質についての染色の増加が観察されたが、TAC + 抗TGF- β 抗体処置レシピエントではほぼ正常であった (図8)。

10

【0113】

実施例9：TGF- β の循環レベルに対するTACの効果

図9は、TACによる長期処置が、同系移植コントロールと比較して、TGF- β タンパク質の循環レベルの有意な増加を生じた (9.8 ± 1.7 対 5.7 ± 6 ng/ml ; $p < 0.01$) ことを実証した。TGF- β レベルでは、同系移植とTAC + コントロール抗体処置レシピエント (5.7 ± 6 対 5.2 ± 6 ng/ml) との間に差異が認められなかった ; しかし、TACおよびTAC + 抗TGF- β 抗体処置レシピエントの間では統計的有意差 (9.8 ± 1.3 対 5.7 ± 6 ng/ml ; $p < 0.01$) が観察された。

20

【0114】

本明細書は、本明細書内において引用した参考文献の教示内容と照らし合わせて、ほぼ完全に理解される。本明細書内の実施態様は、本発明の実施態様の例示を提供するが、これは、本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきではない。当業者であれば、他の多くの実施態様が本発明に包含されることを容易に認識する。本開示物において引用したすべての刊行物、特許、特許出願、および生物学的配列は、それらの全体が参考として引用される。本明細書におけるいずれの参考文献の引用も、そのような参考文献が本発明に先行する技術であることを認めていない。

30

【0115】

他に明記しない限り、特許請求の範囲を含む本明細書において、成分、細胞培養、処置条件などの数量を表現するすべての数は、すべての場合において、用語「約」によって修飾されることが理解されるべきである。従って、対照的に、他に明記しない限り、数的パラメータは近似値であり、本発明によって得られることが求められる所望される特性に依存して、変動してもよい。他に明記しない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、連続しているすべての要素を指すと理解されるべきである。当業者であれば、本明細書に記載の本発明の特定の実施態様に対する多くの等価物を認識し、日常的域を超えない程度の実験を使用して、これを確かめることが可能である。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

40

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1】CsAの免疫抑制効果に対する高用量の抗TGF- β 抗体のネガティブな効果および腎毒性に対するより低用量の抗体の有益な効果を示すKaplan-Meierグラフを示す。CsAに加えて、レシピエントはまた、抗TGF- β またはコントロール抗体 (それぞれ2.5もしくは1.0 mg/kg) で、週3回処置された。群には次のものが含まれた : 同系移植、非処置同種移植、CsA処置同種移植、CsA + コントロール抗体 (2.5 mg/kg)、CsA + 抗TGF- β 抗体 (2.5 mg/kg)、CsA + コン

50

トロール抗体 (1 . 0 m g / k g)、C s A + 抗 T G F - 抗体 (1 . 0 m g / k g)、およびアイソタイプ抗体コントロール。2 . 5 m g / k g 用量の抗 T G F - 抗体は C s A の免疫抑制効果を無効にするが、1 . 0 m g / k g では無効にしない。C s A + コントロール抗体処置レシピエントは、抗 T G F - 抗体処置レシピエントと比較して、移植片拒絶を示さなかったが、屠殺した。

【図 2】図 1 に記載の多様な処置群における T G F - 、コラーゲン、およびフィブロネクチン m R N A の腎内発現レベルを示す。結果を、ハウスキーピング遺伝子、 α -アクチンに対する T G F - 、コラーゲンまたはフィブロネクチンの比として表す。同系移植と比較して、C s A 処置レシピエントにおいて、T G F - 、コラーゲン、およびフィブロネクチン m R N A の発現の統計的に有意な増加が認められる。C s A 処置動物と比較して、C s A + 抗 T G F - 抗体群において、T G F - 、コラーゲン、およびフィブロネクチン m R N A の発現の統計的に有意な減少が認められる一方、C s A + コントロール抗体群との差異は存在しない。(P 値は次のとおりである：T G F - * p < 0 . 0 2 および ** p < 0 . 0 0 3 ; コラーゲン ! p < 0 . 0 0 0 1 および !! p < 0 . 0 0 8 ; フィブロネクチン # p < 0 . 0 0 0 1 および ## p < 0 . 0 0 2 。)

【図 3】M M P - 2 および T I M P - 2 m R N A の腎内発現を示す。結果を、ハウスキーピング遺伝子、 α -アクチンに対する M M P - 2 および T I M P - 2 の比として表す。同系移植と比較して、C s A 処置レシピエントにおいて、M M P - 2 および T I M P - 2 の発現の統計的に有意な増加が認められる。C s A 処置動物と比較して、C s A + 抗 T G F - 抗体群において、M M P - 2 の発現の統計的に有意な減少が認められる一方、C s A + コントロール抗体群との差異は存在しない。T I M P - 2 については、C s A 処置動物と比較して、C s A + 抗 T G F - 抗体群において、発現の減少が認められる(但し、統計的に有意ではない)。(P 値は次のとおりである：M M P - 2 * p < 0 . 0 0 0 2 および ** p < 0 . 0 0 4 ; T I M P - 2 ! p < 0 . 0 3 および !! p < 0 . 1 8 。)

【図 4】図 1 に記載の 1 m g / k g 抗 T G F - 抗体で処置した動物における T G F - の血漿レベルを示す。同系移植コントロールと比較して、C s A で処置した動物において、血漿中 T G F - レベルの統計的に有意な増加が認められる。C s A 処置動物と比較して、C s A + 抗 T G F - 抗体群において、T G F - レベルの統計的に有意な減少が認められる。(P 値は次のとおりである：* p < 0 . 0 0 0 1 および ** p < 0 . 0 0 3 。)

【図 5】腎移植レシピエントの腎機能に対する T A C および / または抗 T G F - 抗体の効果を実証する。図 5 A は、0 . 2 5 m g / k g の T A C で 9 0 日間処置した動物または同系移植コントロールにおける B U N レベルを示す。T A C に加えて、レシピエントをまた、抗 T G F - またはコントロール抗体 (それぞれ 1 m g / k g) で、週 2 回処置した。群には次のものが含まれた：同系移植、T A C 処置同種移植、T A C + コントロール抗体、および T A C + 抗 T G F - 抗体。同系移植コントロール (p < 0 . 0 0 0 1) またはコントロール抗体と比較して、T A C 処置動物において、B U N レベルの統計的に有意な増加を観察した。抗 T G F - 抗体を伴う処置では、T A C 単独と比較して、B U N レベルが減少した (p < 0 . 0 1)。コントロール抗体を伴う処置においてもまた、B U N レベルが若干減少したが、この減少は統計的に有意ではなかった。図 5 B は、T A C で処置した動物または同系移植コントロールのクレアチニンレベルを示す。動物を、図 5 A について記載のように処置した。同系移植コントロール (p < 0 . 0 4) またはコントロール抗体と比較して、T A C 単独で処置した動物において、クレアチニンレベルの統計的に有意な増加を観察した。抗 T G F - 抗体を伴う処置では、T A C 単独と比較して、B U N レベルが減少した (p < 0 . 0 2)。コントロール抗体を伴う処置においてもまた、クレアチニンレベルが若干減少したが、この減少は統計的に有意ではなかった。

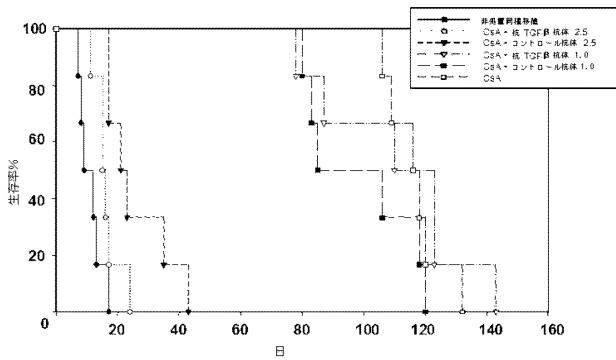
【図 6】T G F - 、N O X - 1、p 2 2 ^{P h o x}、および R a c - 1 m R N A の腎内発現に対する抗 T G F - 抗体の効果を示す。動物を、図 5 A について記載のように処置した。抗 T G F - 抗体は、T A C 誘導性腎内 T G F - 、N O X - 1、p 2 2 ^{P h o x}、および R a c - 1 m R N A 発現を阻害したが、コントロール抗体は阻害しなかった。

【図7】ラット腎移植におけるTGF- β 、SOD、およびTRX mRNA発現に対するTACの効果を示す。動物を、図5Aについて記載のように処置した。TGF- β 対SODおよびTRX mRNAは、TAC処置ラット移植レシピエントにおいてレシプロカルに発現されることを見出した。抗TGF- β 抗体は腎内TGF- β を阻害するが、SODおよびTRX mRNA発現を部分的に回復した。

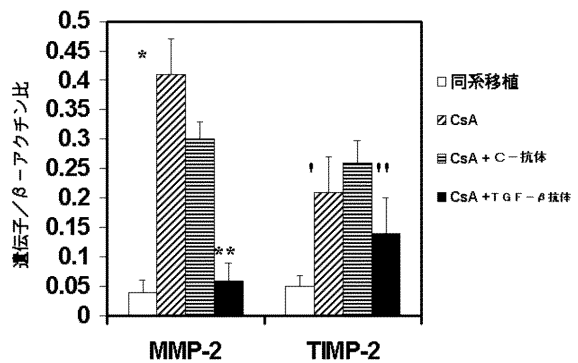
【図8】図5Aについて記載のように処置された動物におけるp22^{phox}およびNOX-1発現のウェスタンブロット分析の結果を示す。p22^{phox}およびNOX-1の腎内発現は、非処置同種移植（最後の2つのレーン）および同系移植コントロール（最初の2つのレーン）の両方と比較して、TACによる処置後に上昇した。

【図9】腎移植レシピエントのTGF- β タンパク質の循環レベルに対するTACおよび/または抗TGF- β 抗体の効果を示す。動物を、図5Aについて記載のように処置した。血漿サンプル中のTGF- β タンパク質の循環レベルをELISAによって定量した。TAC処置レシピエントは、同系移植コントロールと比較して、TGF- β 発現の統計的に有意な増加を示した。TAC処置動物と比較して、TAC+抗TGF- β 抗体群において、TGF- β レベルの統計的に有意な減少を観察した；TAC単独による処置に関しては、TAC+コントロール抗体処置レシピエントと比較して、TGF- β 発現の統計的に有意な差異は観察されなかった。（P値は次のとおりである：* p < 0.01および** p < 0.01）。

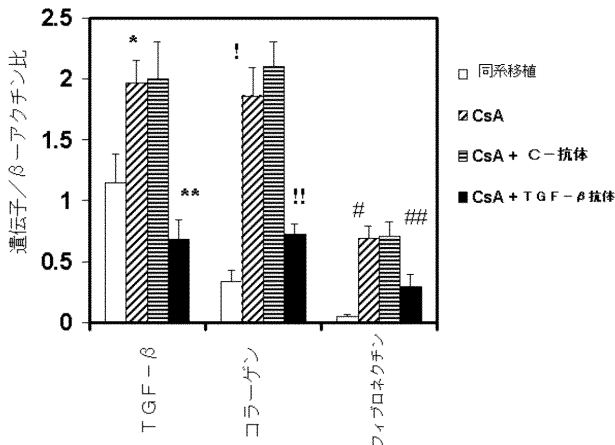
【図1】



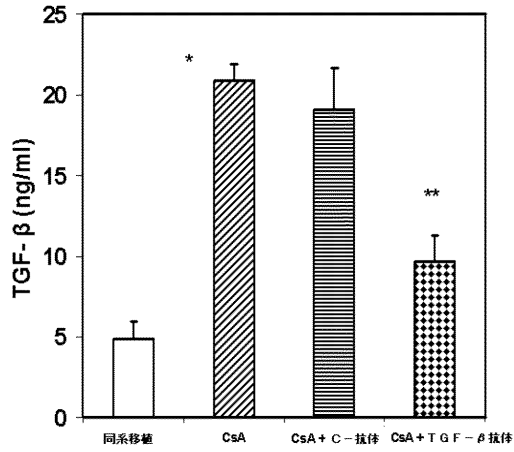
【図3】



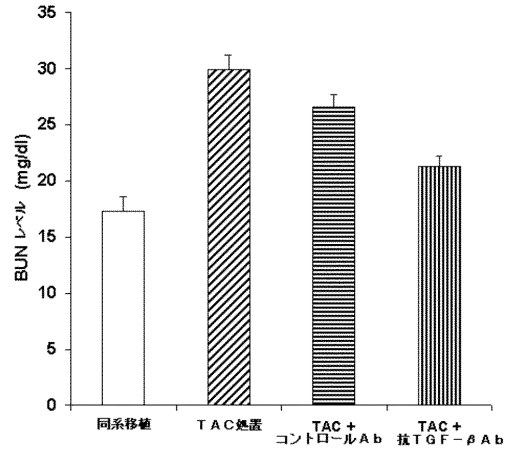
【図2】



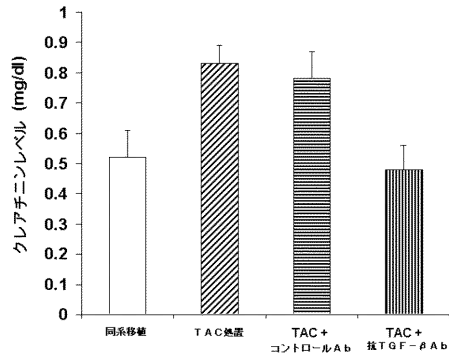
【 図 4 】



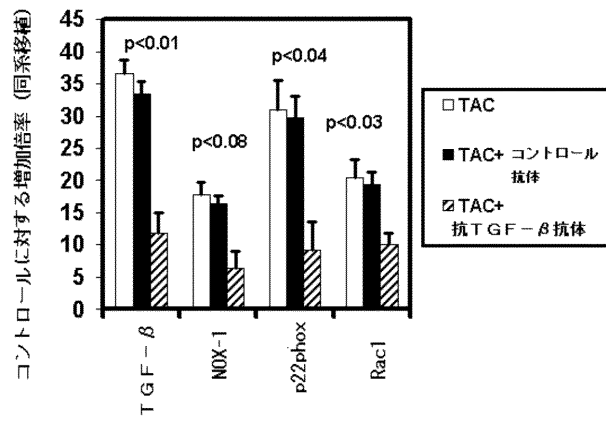
【 図 5 A 】



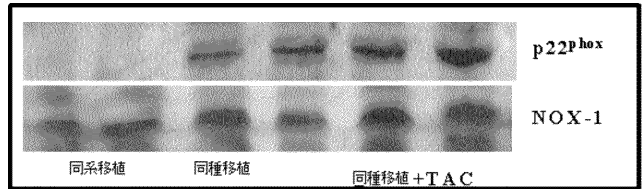
【 図 5 B 】



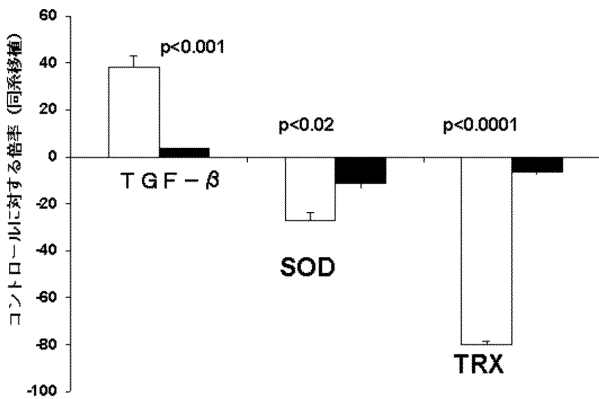
【 図 6 】



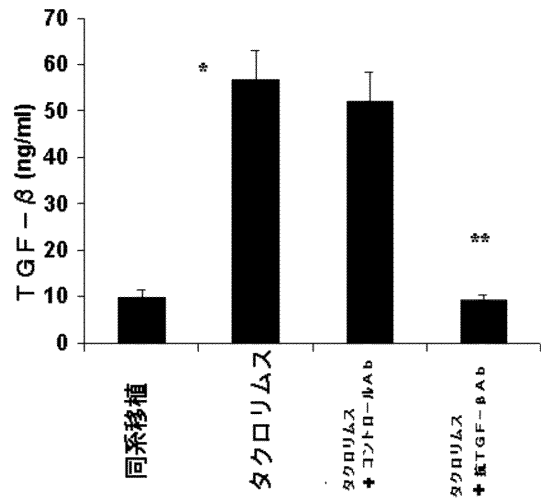
【 図 8 】



【 図 7 】



【 図 9 】



【配列表】

2008513542000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年5月22日(2007.5.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008513542000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/033942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/18		
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		
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, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/060362 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC; SCARBOROUGH, ROBERT, M; PANDEY, ANJAL) 22 July 2004 (2004-07-22) page 5, line 19 - page 7, line 13 page 35, lines 24-28 page 38, lines 6-16	1-22
X	US 2003/069248 A1 (CHAKRAVARTY SARVAJIT ET AL) 10 April 2003 (2003-04-10) paragraph [0004] paragraph [0022] paragraph [0073]	1-22
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "8" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 February 2006	30. 05. 2006	
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. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Engl, B	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2005/033942

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 492 497 B1 (THOMPSON JULIA ELIZABETH ET AL) 10 December 2002 (2002-12-10) column 1, lines 37-48 column 11, lines 45-47 column 13, line 66 - column 14, line 3 column 15, line 57 - column 16, line 13 column 17, lines 10-13	1-22
P,X	KHANNA A K; PLUMMER M S; HILTON G; PIEPER G M; LEDBETTER S: "Anti-Transforming Growth Factor Antibody at low but not high doses limits Cyclosporine-mediated nephrotoxicity without altering rat cardiac allograft survival" CIRCULATION, vol. 110, no. 25, 21 December 2004 (2004-12-21), pages 3822-3829, XP002367170 the whole document	1-22
X	JING XIN; TOSHIO HOMMA; TAIJI MATSUSAKA; JI MA; YOSHITAKA ISAKA; ENYU IMAI; IEKUNI ICHIKAWA: "Suppression of Cyclosporine A nephrotoxicity in vivo by Transforming Growth Factor beta Receptor-Immunoglobulin G chimeric protein" TRANSPLANTATION, vol. 77, no. 9, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 1433-1442, XP002367171 page 1439, left-hand column, line 1 - page 1440, right-hand column, line 6 page 1441, right-hand column, lines 25-44	1-22
X	HONG LING, XUEMEI LI; SHARDA JHA; WEI WANG; LINA KARETSKAYA; BRUCE PRATT; STEVEN LEDBETTER: "Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse Cyclosporin A nephropathy: Morphologic improvement associated with functional preservation" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 14, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 377-388, XP002289846 ISSN: 1046-6673 page 387, left-hand column, lines 8-16	1-22

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/033942

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISLAM M; BURKE J F JR; MCGOWAN T A; ZHU Y; DUNN S R; MCCUE P; KANALAS J; SHARMA K: "Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 59, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 498-506, XP002367172 page 505, left-hand column, lines 37-42	1-22
X	KHANNA A K; CAIRNS V R; BECKER C G; HOSENPUD J D: "Transforming growth factor (TGF)-[beta] mimics and anti-TGF-[beta] antibody abrogates the in vivo effects of Cyclosporine" TRANSPLANTATION, vol. 67, no. 6, 27 March 1999 (1999-03-27), pages 882-889, XP002367173 the whole document	1-22
Y	SHIHAB F S; BENNET W M; YI H; CHOI S O; ANDOH T F: "Sirolimus increases transforming growth factor -beta1 expression and potentiates chronic cyclosporine nephrotoxicity" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 65, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 1262-1271, XP002367174 the whole document	1-22
Y	NINOVA D; COVARRUBIAS M; REA D J; PARK W D; GRANDE J P; STEGALL M D: "Acute nephrotoxicity of Tacrolimus and Sirolimus in renal isografts: Differential intragraft expression of Transforming Growth Factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin" TRANSPLANTATION (HAGERSTOWN), vol. 78, no. 3, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 338-344, XP002367311 the whole document	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/033942**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
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 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:

see additional sheet

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

1-22

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2005 /033942

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

The expressions "TGF-beta antagonist" and "immunosuppressive agent" are directed to an infinite number of substances and therefore cannot be searched completely. The said expressions are also considered to lack support in description since while there is a huge number of known TGF-beta antagonists and immunosuppressive agents, only anti-TGF-beta antibodies as TGF-beta antagonist and cyclosporine A and tacrolimus as immunosuppressants have been explored and tested according to the application. Furthermore, an objection to lack of unity a posteriori would theoretically arise for the present claims since TGF-beta antagonists are known for treating the nephrotoxic effects of cyclosporine. The groups of inventions which cannot be unified would be equal the number of conceivable TGF-beta antagonists multiplied by the number of conceivable immunosuppressants, i.e. would be infinite. The search was therefore based essentially on the substances which are explicitly mentioned in the application, i.e. anti-TGF-beta antibodies, cyclosporine A and tacrolimus.

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, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/US2005 /033942

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-22

Method of counteracting the nephrotoxic effects of an immunosuppressant by administering a TGF-beta antagonist

2. claims: 23,24

Method of detecting nephrotoxicity of an immunosuppressant by determining the levels of TGF-beta, NOX-1, p22phox, RAC-1, SOD and TRX in a biological sample

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/033942

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004060362	A	AU 2003300099 A1 EP 1581222 A2	29-07-2004 05-10-2005
US 2003069248	A1	US 6277989 B1 US 2002161010 A1	21-08-2001 31-10-2002
US 6492497	B1	US 2003091566 A1 US 2003064069 A1	15-05-2003 03-04-2003

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M

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

(74) 代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74) 代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74) 代理人 100116311

弁理士 元山 忠行

(74) 代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72) 発明者 アシュワニ・ケイ・カンナ

アメリカ合衆国 5 3 0 4 5 ウィスコンシン州ブルックフィールド、パーウィック・コート 2 8 8 5 番

(72) 発明者 スティーブン・レッドベター

アメリカ合衆国 0 1 5 8 1 マサチューセッツ州ウエストバーロウ、ラグルズ・ストリート 1 3 8 番

F ターム (参考) 4C084 AA17 NA06 NA14 ZA81 ZB05 ZB07 ZB08

4C085 AA13 AA14 BB17 CC23 EE01

专利名称(译)	使用TGF-β拮抗剂来限制免疫抑制剂的肾毒性		
公开(公告)号	JP2008513542A	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2007533623	申请日	2005-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	建新公司 迪MC AW过研究基金会有限公司		
申请(专利权)人(译)	Genzyme公司 迪MC AW在研究的基础上，公司		
[标]发明人	アシュワニケイカンナ スティーブンレッドベター		
发明人	アシュワニケイカンナ スティーブン・レッドベター		
IPC分类号	A61K45/00 A61P13/12 A61K39/395 A61P37/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K35/22 A61K38/13 A61K38/179 A61K39/3955 A61K2039/505 A61P13/12 C07K16/22 A61K2300/00		
FI分类号	A61K45/00 A61P13/12 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/00 G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA06 4C084/NA14 4C084/ZA81 4C084/ZB05 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/CC23 4C085/EE01		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/612187 2004-09-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及减轻免疫抑制剂的肾毒性副作用的方法，其中免疫抑制活性通过例如环孢菌素 (CsA) 的TGF-β的上调来介导。本公开提供了用于需要免疫抑制的患者的治疗方面，例如，在具有移植排斥风险的患者或患有自身免疫疾病的患者中。在本发明的方法中，将TGF-β拮抗剂，例如抗TGF-β抗体给予待用免疫抑制剂治疗的患者。这种TGF-β拮抗剂以足以减轻免疫抑制剂的肾毒性作用的治疗有效量给药，而基本上不干扰该药剂的免疫抑制活性。