

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年9月18日 (18.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/111503 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/22 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/054133
- (22) 国際出願日: 2008年3月7日 (07.03.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-059632 2007年3月9日 (09.03.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 帯広畜産大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稲田町西2線11番地 Hokkaido (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 宏志 (SUZUKI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒0800028 北海道帯広市西18条南2丁目2番56号 Hokkaido (JP). 斉藤 英樹 (SAITO, Hideki) [JP/JP]; 〒1038324 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, ICHIO et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, 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) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: PROTECTIVE AGENT FOR TRANSPLANTED ORGAN

(54) 発明の名称: 移植臓器保護剤

(57) Abstract: A composition for protecting a transplanted organ, a composition for promoting the survival of a transplanted organ, or a composition for preserving a transplanted organ, each containing erythropoietin (EPO) as the active ingredient.

(57) 要約: エリスロポエチン (EPO) を有効成分とする移植臓器保護用組成物、移植臓器の生着促進用組成物、若しくは移植臓器保存用組成物。



WO 2008/111503 A1

明 細 書

移植臓器保護剤

技術分野

[0001] 本発明は、新規な移植臓器保護用組成物、特に移植臓器の生着促進効果を有する組成物に関する。

背景技術

[0002] エリスロポエチン(以下においてEPOと記載することもある)は、赤血球系前駆細胞の分化、増殖を促進する酸性糖タンパク質ホルモンであり、主として腎臓から産生される。EPOは生体の赤血球の恒常性維持において中心的な役割を担っており、臨床的にはEPOは貧血の治療や術前術後の管理に利用されている。

[0003] EPOは、造血因子としての働きの他に、神経系細胞、心筋細胞、腎尿細管上皮細胞などでアポトーシス抑制や組織保護の作用をすることが知られている(PNAS 100:4802-4806, 2003他)。EPOの有するこのような2つの作用は、EPOが2つの異なるシグナル伝達経路によって作用するためであると考えられている。EPOがEPO受容体のホモダイマーに作用すると、細胞内のJAK2シグナル伝達経路を通じて造血作用を及ぼす。一方、EPOがEPO受容体とcommon β 受容体(β cR)とのヘテロダイマーに作用すると、細胞内のERK1/2シグナル伝達経路を通じて抗アポトーシス作用を及ぼす(PNAS 101:14907-14912, 2004)。

[0004] 近年、臓器移植手術が行われているが、臓器移植手術のために臓器提供者(ドナー)から摘出された移植用臓器は、血流が途絶し血流を介した酸素の供給がない状態(虚血状態)で、移植まで数分から数十時間保存される。このために、保存温度や保存液などの保存条件が適切に選択されなかったり、移植までに長時間を要すると、移植によって移植臓器内の血流が回復した際(再灌流時)に、移植臓器に基質的あるいは機能的な障害が生じる場合がある。

[0005] これまでに移植臓器保護剤として、アミノベンゼンスルホン酸誘導体(WO 2004/022545)、4-トリフルオロメチルピリミジン誘導体(特開2005-350363)、プリン誘導体(特開2005-350364)等が知られている。

[0006] しかしながら、EPOによる移植臓器に対する保護効果は知られていない。また、生着促進効果を有する移植臓器保護剤も知られていない。

非特許文献1:PNAS 100:4802-4806, 2003

非特許文献2:PNAS 101:14907-14912, 2004

特許文献1:WO 2004/022545

特許文献2:特開2005-350363

特許文献3:特開2005-350364

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、新規な移植臓器保護用組成物、特に移植臓器の生着促進効果を有する組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記目的を解決するために鋭意研究した結果、エリスロポエチンが移植臓器保護作用、特に移植臓器の生着促進効果を有することを見出して本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

(1) エリスロポエチンを有効成分として含有する、移植臓器保護用組成物。

(2) エリスロポエチンを有効成分として含有する、移植臓器の生着促進用組成物。

(3) エリスロポエチンを有効成分として含有する、移植臓器保存用組成物。

(4) 上記エリスロポエチンがアシアロ化されたエリスロポエチンである(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) エリスロポエチンを有効成分として含有する組成物を移植臓器に直接投与する工程を含む、移植臓器を移植時の再灌流障害から保護する方法。

(6) エリスロポエチンを有効成分として含有する組成物を移植臓器に直接投与する工程を含む、移植臓器の、被移植対象への生着を促進する方法。

(7) 移植臓器を移植時の再灌流障害から保護するための医療用組成物を製造するためのエリスロポエチンの使用。

(8) 移植臓器の、被移植対象への生着を促進するための医療用組成物を製造する

ためのエリスロポエチンの使用。

発明の効果

[0010] 後述する実施例に示すように、本発明の組成物は、移植時の血液再灌流によって生じる障害から移植臓器を保護し、被移植対象への生着の促進効果を示す。本発明の組成物は、移植する臓器に直接EPOを投与することで上記の効果を得ることができる。特にアジアロEPOの場合には優れた効果を確認することができた。

[0011] また、移植臓器の保存用組成物としても使用することにより、移植後に、移植臓器の保護、生着の促進が考えられる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]移植後の卵巣における0.64平方mmあたりの平均卵胞数および移植前卵巣の卵胞数に対する残存率を示すグラフである。結果は、平均±標準偏差で示す。星印は、試験群の間に有意差があることを示す(*:p<0.05)。

発明を実施するための最良の形態

[0013] エリスロポエチン

本発明に用いるエリスロポエチンは、どのようなエリスロポエチンでも用いることができるが、好ましくは高度に精製されたエリスロポエチンであり、より具体的には、哺乳動物EPO、特にヒトEPOと実質的に同じ生物学的活性を有するものである。

[0014] 本発明で用いるエリスロポエチンは、いかなる方法で製造されたものでもよく、例えば、ヒト由来の抽出物から精製して得られた天然のヒトEPO(特公平1-38800号公報、など)や、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、C127細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、BHK細胞、昆虫細胞、などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したヒトEPOなどを用いることができる。本発明において用いられるエリスロポエチンは、遺伝子工学的手法により製造されたEPOが好ましく、哺乳動物細胞(特にCHO細胞)を用いて製造されたEPOが好ましい(例えば、特公平1-44317号公報、Kenneth Jacobs et al., Nature, 313 806-810 (1985)、など)。

[0015] 遺伝子組換え法により得られるエリスロポエチンには、天然由来のEPOとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列中の1または複数のアミノ酸を欠失、置

換、付加等したもので、天然由来のEPOと同様の生物学的活性を有するもの等であってもよい。アミノ酸の欠失、置換、付加などは当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法(Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer, W. and Fritz, H.J. (1987) Methods Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488-492; Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、EPOのアミノ酸に適宜変異を導入することにより、EPOと機能的に同等なポリペプチドを調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。一般的に、置換されるアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に置換されることが好ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H, F, Y, W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M.J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500; Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

[0016] 又、本発明のエリスロポエチンとして、EPOと他のタンパク質との融合タンパク質を用いることも可能である。融合ポリペプチドを作製するには、例えば、EPOをコードするDNAと他のタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよい。本発明のエリスロポエチンとの融合に付される他のタンパク質は、特に限定されない。

- [0017] 又、本発明のエリスロポエチンとして、化学修飾したEPOを用いることも可能である。化学修飾したEPOの例として、例えば、ポリエチレングリコール等により化学修飾されたEPO(WO90/12874など)、糖鎖のついていないEPOをポリエチレングリコール等により化学修飾したもの、その他、ビタミンB12等、無機あるいは有機化合物等の化合物を結合させたEPOなどを挙げるができる。
- [0018] さらに、本発明のエリスロポエチンとしてEPO誘導体を用いることも可能である。EPO誘導体とは、EPO分子中のアミノ酸を修飾したEPO又はEPO分子中の糖鎖を修飾したEPOのことをいう。
- [0019] EPO分子中の糖鎖の修飾としては、糖鎖の付加、置換、欠失などが含まれる。本発明において好ましい糖鎖の修飾としては、EPO分子中のシアル酸の欠失を挙げることができる。
- [0020] 通常、組換え動物細胞により生産したEPO、尿由来のEPOのいずれも、糖鎖構造の異なる多様なEPOを含むEPO組成物として得られる。EPO組成物中のEPO分子に付加しているシアル酸の数は、個々のEPO分子によって異なるが、通常、1つのEPO分子に11個～15個のシアル酸が付加している。これらのシアル酸を除去することによりアシアロ化されたEPO(アシアロEPO)を作製することが可能である。アシアロ化の際に除去されるシアル酸の数は特に限定されず、全てのシアル酸を除去してもよいし、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14個のシアル酸を除去してもよい。本発明において好ましいアシアロEPOは、EPO分子に付加しているシアル酸の数が10個以下であり、さらに好ましくは5個以下であり、特に好ましくは2個以下である。なお、本発明において用いられるシアル酸の数は、EPO組成物に含まれているEPO分子の平均数を用いる。1分子あたりのシアル酸の平均は当業者に公知の方法によって測定することが可能である(EP0428267公報、など)。
- [0021] シアル酸が除去されたEPO(アシアロEPO)は当業者に公知の方法で作製することができ、例えば、シアリダーゼなどの酵素でEPOを処理すること等により作製することが可能である。シアリダーゼは市販されているものを用いることが可能である。(特表2005-507426号、Nobuo Imai et al., Eur.J.Biochem, 194, 457-462 (1990)、など)
- さらには、本発明のエリスロポエチンは、糖鎖改変体EPOであってもよく、これにはE

POのN末端にシアル酸が付着した糖鎖改変体EPOであるNESP (Novel Erythropoietin Stimulating Protein: WO85/02610、WO91/05867、WO95/05465等に記載)などの糖鎖の改変されたEPO類似体が挙げられる。

[0022] EPO分子中のアミノ酸の修飾としては、カルバミル化、ビオチン化、アミジン化、アセチル化、グアニジン化、などを挙げることができる。

[0023] 修飾されるアミノ酸残基は特に限定されず、例えば、リジン、アルギニン、グルタミン酸、トリプトファンなどを挙げることができる。

組成物

本発明の組成物には、必要に応じて、懸濁剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を適宜添加することができる。

[0024] 懸濁剤の例としては、メチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができる。

[0025] 溶液補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等を挙げることができる。

[0026] 安定化剤としては、デキストラン40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる。

[0027] また、安定化剤としてある種のアミノ酸を添加することも可能である(例えば、特開平10-182481号公報など)。安定化剤として添加されるアミノ酸には、遊離のアミノ酸、そのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩などが含まれる。アミノ酸は1種又は2種以上を組み合わせることで添加することができる。安定化剤として添加されるアミノ酸は特に限定されないが、好ましいアミノ酸としては、ロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、リジンを挙げることができる。

[0028] 等張化剤としては例えば、D-マンニトール、ソルビート等を挙げることができる。

[0029] 保存剤としては例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を挙げることができる。

- [0030] 吸着防止剤としては例えば、ヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。
- [0031] 界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB6～18を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレン

ラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2~4でアルキル基の炭素原子数が10~18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩;ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8~18のアルキルスルホコハク酸エステル塩;天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質;スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質;炭素原子数12~18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げる事ができる。本発明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる事ができる。好ましい界面活性剤は、ポリソルベート20, 40, 60又は80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート20及び80が特に好ましい。また、ポロキサマー(プルロニックF-68(登録商標)など)に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

- [0032] 含硫還元剤としては例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数1~7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。
- [0033] 酸化防止剤としては例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。
- [0034] さらに、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩;クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでもよい。
- [0035] 本発明のエリスロポエチン含有組成物における、有効成分の含有量は、移植臓器の状態や大きさ、患者(移植者、非移植者)の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜各有効成分毎に決定する。通常、10~1000U/kg体重、好ましくは100~600U/kg体重程度である。

[0036] 本発明のエリスロポエチン含有組成物は、被移植者(レシピエント)に対する移植手術中および／または術前・術後において被移植者に投与することができるが、好ましくは、移植臓器に直接投与することによって本発明の効果を得ることができる。投与は、移植者(ドナー)から摘出した臓器を移植前に当該組成物に直接接触させることで投与してもよいし、下記実施例に記載のように、スポンジ等に染み込ませて投与することもできる。また、移植前の保存液として使用してもよい。保存液の添加物として、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、クエン酸緩衝液などの生理的に許容される緩衝液や等張化液を用いることができる。また従来から移植用臓器の保存液として臨床的に用いられているユーロ・コリンズ液やUW液などと併用することも可能である。

実施例

[0037] 実施例1:凍結融解イヌ卵巣の異種移植時におけるEPOおよびアジアロEPOの投与効果

(1) 目的

凍結融解イヌ卵巣をNOD-SCIDマウスの卵巣嚢内に異種移植した場合、イヌ卵巣の生着は高頻度に認められるが、移植後の血管再生前に原始卵胞の70%が死滅するという報告があり、またイヌ同種移植試験におけるイヌ卵巣においても原始卵胞およびその他の卵胞が移植前の卵巣より減少する傾向が観察された。

[0038] そこで、EPOおよびアジアロEPOを局所投与し、移植後のイヌ卵巣の原始卵胞減少の抑制効果について検討した。

(2) 材料と方法

4ヶ月齢のイヌの卵巣を、凍結融解しNOD-SCIDマウスの卵巣嚢内に移植した。凍結融解操作はMigishimaらの方法(Migishima F et al., Biol Reprod 2003 Mar;68(3):81-7)に準拠して行い、卵巣移植はIshijimaらの方法(Ishijima T et al., J Reprod Dev. 2006 Apr;52(2):293-9)に従って行った。

(2.1) 凍結操作

イヌ卵巣組織を1.0mm-1.5mm角に細切し、室温下の1M DMSOに60秒程度浸漬した後、5 μ lの1M DMSOと共にクライオチューブ内へ入れ、氷上にて5分冷却した。あ

らかじめ氷上で冷却しておいた95 μ lのDAP213を添加した後、氷上にて5分冷却し、液体窒素中に浸漬した。

(2. 2) 融解操作

液体窒素中よりチューブを取り出し、チューブ内の液体窒素を捨て、室温にて60秒放置した。37°Cに加温しておいた900 μ lの0.25Mスクロースを添加し、すばやく緩やかにピペッティングし、PBIで5回洗浄した。

[0039] また、摘出したイヌ卵巢の一部は移植前卵巢として、10%ホルマリンにて固定した。

(2. 3) 移植方法

マウス(n=9)はネンブタール腹腔内投与で麻酔後、背面を切開し卵巢を引き出した。卵巢側部の脂肪から切り込みを入れ、卵巢囊内のマウス卵巢を、移植後のイヌ卵巢への血流確保のため、一部を残すように取り除き、そこ(卵巢囊内)へ凍結融解したイヌ卵巢を入れた。その際、止血用スポンジ(以下スポンゼル)にEPO(n=3)およびアジアロEPO(n=3)を400U/kg染み込ませたものを卵巢囊内に入れた。また、コントロールとして生理食塩水を使用し、同等量スポンゼルに染み込ませ、卵巢囊内に入れた。

[0040] 4週間後、卵巢を取り出し、10%ホルマリンにて固定し、移植前卵巢とともにHE染色に供した。

(2. 4) 切片作成と卵胞検索

卵胞の分類はOktayら(Oktay K et al., Biol Reprod.1995 Aug;53(2):295-301)の分類に準拠し、卵子(卵母細胞)の実質が確認できるものについて以下の要領で数えた。

[0041] 原始卵胞(Primordial)は、卵母細胞が部分的あるいは完全に扁平な前顆粒膜細胞に覆われているもの;初期1次卵胞(Early primary)は、前顆粒膜細胞の少なくともひとつが円柱状に(巨大に)なっているもの;1次卵胞(Primary)は、すべての顆粒膜細胞が大きくなり、1層の顆粒膜細胞で成っているもの;初期2次卵胞(Transitional)は1~2層の円柱状の顆粒膜細胞で覆われているもの;2次卵胞(Preantral)は、2層以上の顆粒膜細胞で覆われており、卵胞腔がない状態のもの;胞状卵胞(Antral follicle)は、2層以上の顆粒膜細胞で覆われており、卵胞腔を伴う状態のもの、とした。

(2. 4. 1) 移植前卵巣組織

組織をランダムに10個選択し、その10組織について卵胞を数えた。選択したそれぞれの組織の一番卵胞が多い直径900 μmの円の中、つまり0.64平方mm視野の卵胞を数えた(計10視野)。これを移植前卵胞数とした。

(2. 4. 2) 移植卵巣組織

1組織(1ブロック)について段階的に5枚切片を作成した。その際の切片と切片は40 μm~50 μmの間隔であった。その1切片のうち、一番卵胞が多い直径900 μmの円の中、つまり0.64平方mm視野の卵胞を数えた(計5視野)。

(3) 結果

得られた結果を表1および図1に示す。

[0042] [表1]

使用イヌ卵巣: ミニチュア・ダックスフンド 4ヶ月齢 未発情
 使用マウス: NOD-SCIDマウス 11週齢 n=9

実験区	マウス番号	原始	初期一次	一次	初期二次	二次	胞状	合計
移植前		14.8	3.3	4.1	3.6	0.8	0.0	26.6
平均卵胞数								
無処理	M1	0.6	0.8	0.4	0.0	0.0	0.0	1.8
		4.1	24.2	9.8	0.0	0.0	-	6.8
無処理	M2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
		0.0	6.1	0.0	0.0	0.0	-	0.8
無処理	M3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
		2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	-	1.5
無処理	M4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0
EPO	M5	0.8	1.0	0.6	0.0	0.0	0.0	2.4
		5.4	30.3	14.6	0.0	0.0	-	9.0
EPO	M6							
asialoEPO	M7	1.2	1.4	0.2	0.2	0.0	0.0	3.0
		8.1	42.4	4.9	5.6	0.0	-	11.3
asialoEPO	M8	4.6	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0	10.2
		31.1	169.7	0.0	0.0	0.0	-	38.3
asialoEPO	M9	6.0	8.6	1.0	0.0	0.0	0.0	15.6
		40.5	260.6	24.4	0.0	0.0	-	58.6

実験区	原始	初期一次	一次	初期二次	二次	卵胞	合計
無処理	0.3	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.8
	2.3	10.1	3.3	0.0	0.0	-	3.0
EPO	0.4	0.5	0.3	0.0	0.0	0.0	1.2
	2.7	15.2	7.3	0.0	0.0	-	4.5
asialoEPO	3.9	5.2	0.4	0.1	0.0	0.0	9.6
	26.6	157.6	9.8	1.9	0.0	-	36.1

☆ 上段:0.64平方mm視野中の平均卵胞数
 下段:移植前卵巣の卵胞数に対する残存率(%)

移植前の卵巣における0.64平方mmあたりの原始卵胞数は平均14.8個であったの

に対し、移植後4週の有処理群では0.3個、EPO群では0.4個、およびアジアロEPO群では3.9個と特にアジアロEPO群の残存率(27%)が無処理群(2.3%)と比較して有意に高い値であった。

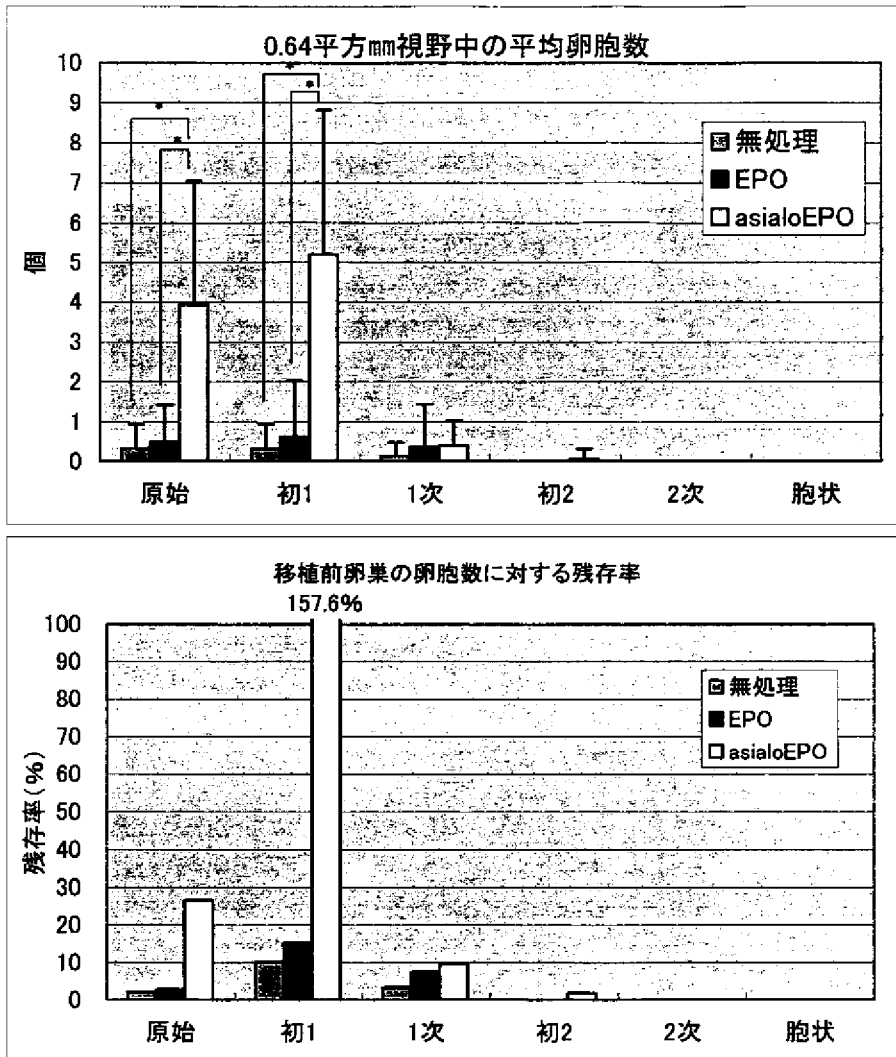
[0043] また、初期一次卵胞については、無処理群の残存率が10.1%であったのに対し、EPO群では15.2%、アジアロEPO群では157.6%を示した。特にアジアロEPO群においては、原始卵胞の一部が初期一次卵胞へ成長していることが明確に示唆されている。さらに、一次卵胞、初期二次卵胞の残存率においても、特にアジアロEPO群が無処理群と比較して高い傾向を認めた。

[0044] 以上の成績より、EPO、特にアジアロEPO投与は移植臓器組織の生着に有効に利用し得ると判断された。

請求の範囲

- [1] エリスロポエチンを有効成分として含有する、移植臓器保護用組成物。
- [2] エリスロポエチンを有効成分として含有する、移植臓器の生着促進用組成物。
- [3] エリスロポエチンを有効成分として含有する、移植臓器保存用組成物。
- [4] 上記エリスロポエチンがアシアロ化されたエリスロポエチンである請求項1～3のいずれかに記載の組成物。
- [5] エリスロポエチンを有効成分として含有する組成物を移植臓器に直接投与する工程を含む、移植臓器を移植時の再灌流障害から保護する方法。
- [6] エリスロポエチンを有効成分として含有する組成物を移植臓器に直接投与する工程を含む、移植臓器の、被移植対象への生着を促進する方法。
- [7] 移植臓器を移植時の再灌流障害から保護するための医療用組成物を製造するためのエリスロポエチンの使用。
- [8] 移植臓器の、被移植対象への生着を促進するための医療用組成物を製造するためのエリスロポエチンの使用。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/054133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K38/22(2006.01) i, A61P37/06(2006.01) i, A61P43/00(2006.01) i

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)
A61K38/22, A61P37/06, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAplus (STN), EMBASE (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2004/99363 A2 (MED GENICS INC.), 18 November, 2004 (18.11.04), Example 7 & US 2004/0241148 A1 & EP 1653807 A	1-2, 7-8 4
X Y	WO 2005/63965 A1 (BIONETHOS HOLDING GMBH), 14 July, 2005 (14.07.05), Pages 50 to 52, 1.ZELLTRANSPLANTATION; pages 52 to 53, 2.POSTOPERATIVE GABE & JP 2007-517001 A & EP 1550715 A1	1-2, 7-8 4
Y	MAI, N. ET AL. 'PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ASIALOERYTHROPOIETIN', EUR. J. BIOCHEM., 1990, VOL.194, P.457-462. ABSTRACT	4

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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 01 April, 2008 (01.04.08)	Date of mailing of the international search report 15 April, 2008 (15.04.08)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/054133

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/2646 A2 (H. LUNDBECK A/S), 12 January, 2006 (12.01.06), Page 29, line 18 to page 30, line 10; page 31, line 1 to page 32, line 7 & US 2006135754 A1 & EP 1781697 A2	3
X	JP 2003-225084 A (Japan Science and Technology Corp.), 12 August, 2003 (12.08.03), Par. No. [0047] & WO 2002/052936 A1	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/054133

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.: 5 - 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 5 to 6 involve embodiments concerning methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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

International application No.

PCT/JP2008/054133

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K38/22(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K38/22, A61P37/06, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2008年
 日本国実用新案登録公報 1996-2008年
 日本国登録実用新案公報 1994-2008年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CPlus (STN), EMBASE (STN),
 JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2004/99363 A2 (MED GENICS INC.) 2004.11.18 EXAMPLE 7	1-2, 7-8
Y	& US 2004/0241148 A1 & EP 1653807 A	4

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 01.04.2008	国際調査報告の発送日 15.04.2008
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐久 敬	4C	4146
	電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2005/63965 A1 (BIONETHOS HOLDING GMBH) 2005.07.14	1-2,7-8
Y	第 5 0 ~ 5 2 頁の 1.ZELLTRANSPLANTATION, 第 5 2 ~ 5 3 頁の 2.POSTOPERATIVE GABE & JP 2007-517001 A & EP 1550715 A1	4
Y	MAI, N. ET AL. 'PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ASIALOERYTHROPOIETIN', EUR. J. BIOCHEM., 1990, VOL.194, P.457-462. ABSTRACT	4
X	WO 2006/2646 A2 (H. LUNDBECK A/S) 2006.01.12 第 2 9 頁第 1 8 行~第 3 0 頁第 1 0 行目、第 3 1 頁第 1 行~第 3 2 頁第 7 行目 & US 2006135754 A1 & EP 1781697 A2	3
X	JP 2003-225084 A (科学技術振興事業団) 2003.08.12 【 0 0 4 7 】 & WO 2002/052936 A1	3

