

Mycophenolic Acid와 Rapamycin의 병합투여가 흰쥐 사구체 혈관간세포의 증식에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 ¹장기이식연구소 및 ²외과학교실, ³원주의과대학 외과학교실, ⁴순천향대학교 현암신장연구소
김명수^{1,3} · 박제현² · 김진수² · 하헌주⁴ · 김혜진² · 허규하² · 문장일¹ · 서지연² · 김유선^{1,2} · 박기일^{1,2}

Effect of Mycophenolic Acid and Rapamycin on the Proliferation of Glomerular Mesangial Cell of Rat

Myoung Soo Kim, M.D.^{1,3}, Jehyun Park, B.S.², Jin Soo Kim, M.D.², Hunjoo Ha, Ph.D.⁴, Hae Jin Kim, B.S.², Kyu Ha Huh, M.D.², Jang Il Moon, M.D.¹, Jiyeon Seo, B.S.², Yu Seun Kim, M.D., Ph.D.^{1,2} and Kiil Park, M.D., Ph.D.^{1,2}

Purpose: Excess proliferation of mesenchymal cells such as vascular smooth muscle cells and glomerular mesangial cells, cause transplant vascular sclerosis and glomerulosclerosis, which are typical pathological lesions of chronic allograft dysfunction. Mycophenolic acid (MPA) and rapamycin (RPM) were recently reported to have strong anti-proliferative potentials toward vascular smooth muscle cells. However, the potential effects of these drugs, either alone or in combination, on glomerular mesangial cells, remain to be reported.

Methods: Primary cultured mesangial cells, from Sprague-Dawley rats, were isolated, and stimulated with 10ng/ml of PDGF. The test drugs MPA and RPM were administered at various concentrations, either alone or in combination, 15 minutes before the addition of the PDGF. The cell proliferation was assessed by [³H]-thymidine incorporation.

Results: The PDGF effectively stimulated the proliferation of the mesangial cells. The MPA inhibited the proliferation in a dose-dependent manner. In comparison to the stimulated control, the MPA (above 500 nM) showed a significant inhibitory effect. The IC₅₀ of the MPA, against PDGF-stimulated mesangial cell proliferation, was between 500 nM and 1 μ M. The RPM, at 10 nM, showed a significant

inhibitory effect. In a linear regression analysis, the RPM was supposed to suppress the mesangial proliferation in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The pattern of inhibition for the MPA and RPM combination was very similar to that of either the MPA or the RPM alone. Both the MPA and RPM were shown to independently suppress the mesangial proliferation from a multiple regression analysis ($R^2=0.415$, $P < 0.001$).

Conclusion: We demonstrated that MPA and RPM significantly inhibited the proliferation of glomerular mesangial cells, and that these effects were well maintained when used in combination. Our data indicate that both MPA and RPM have unique potentials in preventing the development of transplant mesangial proliferation in renal transplant recipients. (*J Korean Surg Soc* 2003;64:372-376)

Key Words: Mycophenolic acid, Rapamycin, Glomerular mesangial cell, Proliferation

중심 단어: 마이코페놀산, 라파마이신, 혈관간세포, 증식

¹The Research Institute for Transplantation and ²Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, ³Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, ⁴Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea

서 론

신이식 후 발생하는 만성 이식신 신증(chronic allograft nephropathy)의 주요병리소견은 혈관경화증(transplant vascular sclerosis), 섬유화, 사구체경화증(glomerulosclerosis) 등으로 구분될 수 있다. 이러한 병리소견은 혈관 평활근세포의 증식과 사구체 혈관간세포(glomerular mesangial cell)의 증식으로 초래되는 것으로 알려져 있다. (1) 사구체 혈관간세포와 세포외기질(extracellular matrix)은 신사구체 총맥(glomerular capillary tuft)의 기능을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 구조로서, 사구체경화증을 일으키는 질환에서 사구체 혈관

책임저자 : 김유선, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-361-5540, Fax: 02-313-8289
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2003년 2월 13일, 게재승인일 : 2003년 3월 17일
본 연구는 연세대학교 의과대학 일반교수연구비(1999-11) 지원과 2002년도 대한이식학회 연구 장학금(로슈) 및 연세대학교 의과대학 장기이식연구소 연구보조금의 일부지원으로 이루어졌음.

간세포의 증식과 세포외기질의 침착은 공통적인 병리조건이다.(2)

만성 이식신 신증에 관련된 혈관경화증과 사구체경화증을 효과적으로 제어하는 방법은 매우 제한적으로 여러 약제를 사용하여 다양한 cytokine과 성장인자의 생성과 발현을 억제하려는 시도가 있어 왔으나 임상에서 그 효과가 확연하게 밝혀진 제제는 아직까지는 없다.(3-5) 그러나 최근에 면역억제제인 mycophenolic acid (MPA)와 rapamycin (RPM)이 거부반응의 주요 표적세포인 림프구뿐만 아니라 혈관 평활근세포와 혈관간세포의 증식도 효과적으로 억제함이 보고되고 있으며,(6-8) 일반적으로 진행성인 신질환인 경우 혈관이나 신실질의 변화는 사구체의 변화와 동시에 발생하며 따라서 각 부분의 변화과정들이 어느 정도 공유된다고 할 수 있으므로,(9) 연구자들은 신사구체 혈관간세포를 대상으로 하여, 상이한 작용기전을 가진 MPA와 RPM 제제를, 단독 또는 병합투여 하여, 이들 제제가 사구체 혈관간세포의 증식억제에 미치는 효과를 확인하고자 연구를 시행하였다.

방 법

1) 흰쥐 사구체 분리 및 혈관간세포의 일차 배양

체중 100 gram 정도의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 마취 후 단두하고 양측 신장을 적출한 후 신피질부를 가위로 잘게 썰어 표준화된 체 거름법(10)을 변형하여 사구체를 분리하고 혈관간세포를 배양하였다. 75 μ m 소공의 체에 걸린 사구체를 취하고 collagenase와 trypsin으로 처리한 후 2,000 rpm에서 원심 분리하여 얻은 사구체를 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS 20%: GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), penicillin (100 U/ml: Sigma Chemical Co.)과 streptomycin (100 μ g/ml: Sigma Chemical Co.)을 함유한 Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM: GIBCO BRL)에서 배양하였다. 2~3일마다 배양액을 새로 공급하고 7~10일마다 trypsin/EDTA (0.25%/0.5%: GIBCO BRL)를 이용하여 계대 배양하고, 5회 계대 배양한 이후의 세포를 본 실험에 사용하였다.

역상 현미경으로 혈관간세포의 형태를 확인하고, 항vimentin 항체 (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)와 항cytokeratin 항체 (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 사구체 혈관간세포임을 확인하였다.

2) 세포 증식의 평가: [³H]thymidine incorporation을 이용한 DNA 합성능 측정

배양기에서 충분히 자란 세포를 trypsin/EDTA (0.25%/0.5%)로 처리한 후 96 well 배양용기(Corning, Corning, NY, USA)에 각 well당 1×10^4 개의 세포가 되도록 분주하여 confluence를 이루게 하였다. 이 세포들을 20% 우태아혈청

이 함유된 DMEM 으로 72시간 배양한 후 혈청배제 DMEM 으로 48시간 동안 배양하여 증식을 억제하였다. 이후 약제를 실험농도로 투여한 후에 PDGF-BB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 well내의 농도가 10 ng/ml으로 되도록 첨가하여 24시간 동안 증식을 유발시킨 후 [³H]thymidine (Du Pont Co., Wilmington, DE, USA)을 각 well에 1 μ Ci/ml의 농도로 첨가하고, 6시간 후 배양세포를 cell harvester (Titertek Cell Harvester 550, Flow Laboratories, Irvine, Scotland, UK)를 이용하여 cell harvester filter (Flow Laboratories, Irvine, Scotland, UK)에 흡착시켜 실온에서 약 6시간 동안 건조시킨 다음 3 ml scintillation cocktail에 넣고 β -counter (TL 5000s, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)로 총 방사능을 측정하였다.

3) 실험약제의 투여

혈관간세포로 배양용기가 찼을 때 혈청배제 DMEM 으로 교환하여 48시간 배양하여 세포 성장을 동일화하였다. 새로운 혈청배제 DMEM으로 교환하면서 10 ng/ml의 PDGF-BB를 투여하였다. MPA과 RPM를 각 well에 투여하고 15분 경과 후에 PDGF-BB를 투여하였다. 약제농도에 따른 MPA와 RPM의 단독 및 병합투여 실험군은 아래와 같다.

- 1) PDGF (10 ng/ml) 투여군(증식대조군)
- 2) MPA 단독투여 실험군: MPA (100 nM), MPA (500 nM), MPA (1 μ M), MPA (10 μ M)
- 3) RPM 단독투여 실험군: RPM (0.1 nM), RPM (1 nM), RPM (10 nM)
- 4) MPA와 RPM 병합투여 실험군
MPA (100 nM) + RPM (0.1 nM), or + RPM(1 nM),
or + RPM(10 nM)
MPA (500 nM) + RPM (0.1 nM), or + RPM (1 nM),
or + RPM (10 nM)
MPA (1 μ M) + RPM (0.1 nM), or + RPM (1 nM),
or + RPM (10 nM)
MPA (10 μ M) + RPM (0.1 nM), or + RPM (1 nM),
or + RPM (10 nM)

4) 통계처리방법

1회의 측정치는 triplicate방법으로 측정된 [³H]thymidine incorporation의 측정치의 평균값으로 대표하였으며, 각 실험 측정치는 6회의 측정치에 대한 평균 \pm 표준편차(Standard deviation)로 표시하였다. 두 군 간의 통계학적인 비교는 Student t-test를, 3군 이상의 통계학적인 비교는 ANOVA with Bonferroni's multiple comparison을 이용하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 약제가 단독으로 사구체 혈관간세포 증식에 미치는 영향은 단순회

귀분석(simple linear regression)으로, 2개 약제의 병합투여 시 증식에 미치는 영향은 다중회귀분석(multiple regression analysis, enter method)을 사용하여, 유의수준 0.05 미만으로 유의성을 판정하였다.

결 과

1) PDGF에 의한 사구체 혈관간세포의 증식유발효과

대조군의 $[H^3]$ thymidine incorporation 은 102.3 ± 27.8 cpm 이었으며 PDGF 10 ng/ml 사용군은 $1,723.0 \pm 528.0$ cpm이었다. PDGF에 의한 증식효과는 대조군의 16.7±0.8배로 통계학적으로 유의한 증식유발효과를 보였다(P=0.001).

2) MPA와 RPM의 증식억제효과: 단독투여효과

MPA 단독투여군의 $[H^3]$ thymidine incorporation은 100 nM에서는 $2,057.8 \pm 424.6$ cpm, 500 nM에서는 606.3 ± 164.1 cpm, 1μM에서는 360.3 ± 134.9 cpm, 10μM에서는 179.8 ± 59.8 cpm으로 사구체 혈관간세포의 증식은 농도 의존적으로 억제되었다. 특히 MPA 500 nM 이상에서는 증식대조군(stimulated control)에 비하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며(P=0.003), MPA의 유효억제농도(IC₅₀, inhibition concentration 50%)는 500 nM과 1μM 사이이었다(Fig. 1).

RPM 0.1 nM, 1 nM 및 10 nM 단독투여군의 $[H^3]$ thymidine incorporation은 각각 $2,040.5 \pm 384.8$, $1,765 \pm 479.0$ 및 $1,314.3 \pm 282.1$ cpm 으로 RPM 10 nM에서만 통계학적으로 유의한 증식억제효과를 보였다(P=0.018). 그러나 RPM의 농도가 증가 할수록 증가억제효과가 증가하는 유의한 선형관계를 보여(P=0.003), RPM의 IC₃₀는 10 nM 이상임을 추정할 수 있었다(Fig. 1).

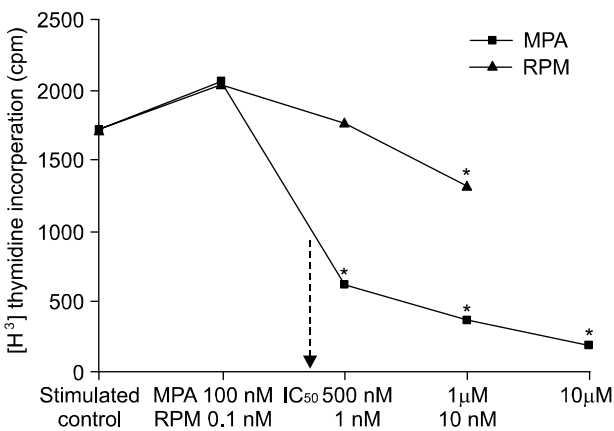


Fig. 1. *In vitro* effect of mycophenolic acid (MPA) or rapamycin (RPM) on the proliferation of mesangial cell *means P-value < 0.05 versus stimulated control by Bonferroni's multiple comparisons

3) MPA와 RPM의 증식억제효과: 병합투여효과

RPM을 각각 0.1, 1, 10 nM의 농도로 고정된 상태에서 MPA의 농도에 따른 증식정도를 살펴보면, MPA의 단독투여와 마찬가지로 MPA 500 nM 이상의 농도에서 증식대조군에 비하여 유의한 증식억제효과를 보였다. 즉 RPM 농도에 관계없이 MPA의 농도가 500 nM 이상인 경우 증식대조군에 비하여 유의한 증식억제효과를 보였으며, RPM의 농도에 따른 차이는 없었다(Fig. 2).

반대로 MPA를 각각 100 nM, 500 nM, 1μM, 10μM로 고정된 상태에서 RPM의 농도에 따른 증식정도를 살펴보면

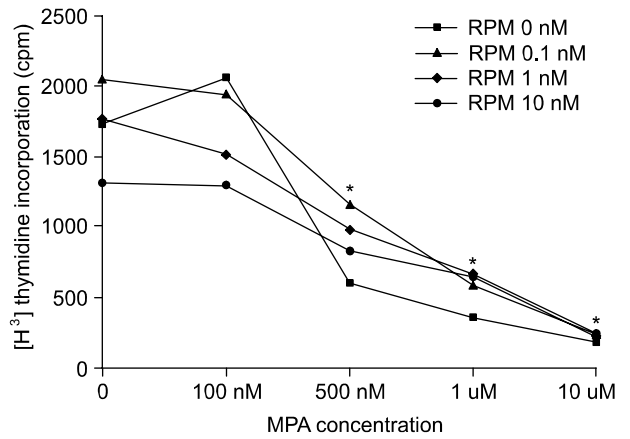


Fig. 2. *In vitro* effects of mycophenolic acid (MPA) on the proliferation of mesangial cell by the co-administered concentrations of rapamycin (RPM), *means P-value < 0.05 versus stimulated control by Bonferroni's multiple comparisons.

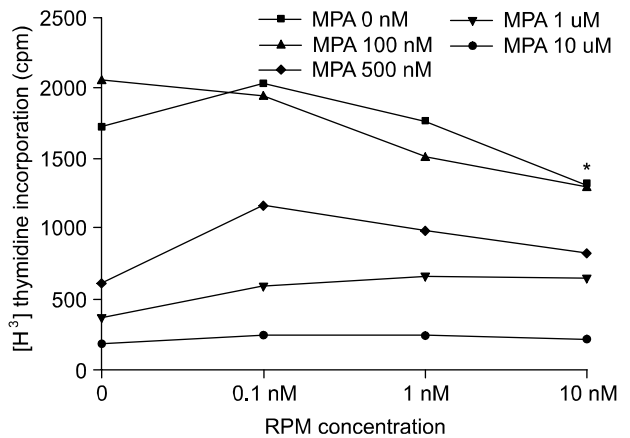


Fig. 3. *In vitro* effects of rapamycin (RPM) on the proliferation of mesangial cell by the co-administered concentrations of mycophenolic acid (MPA), *means P-value < 0.05 versus stimulated control by Bonferroni's multiple comparisons

MPA가 100 nM인 군에서만 RPM의 농도에 따른 유의한 증식억제효과를 확인할 수 있었다. MPA의 농도가 500 nM 이상인 경우에는 RPM의 농도에 따른 증식억제정도는 통계학적으로 유의한 차이가 없이 일정하였다(Fig. 3). 그러나 다중회귀분석을 시행한 결과에서는 사구체 혈관간세포의 증식억제정도는 MPA와 RPM 농도 모두와 음의 상관관계를 가지는 것으로 확인되었으며 비록 결정계수 R^2 는 낮으나 사구체 간세포의 증식정도는 다음의 회귀방정식으로 표현할 수 있다($R^2=0.415$, $P<0.001$).

$$\text{증식정도(cpm)} = 1,344.372 - 113.365 \times \text{MPA 농도}(\mu\text{M}) - 22.142 \times \text{RPM 농도}(n\text{M})$$

고 찰

본 연구자들은 이미 MPA, RPM 및 carvedilol 등이 혈관 평활근세포의 증식을 효과적으로 억제함을 보고한 바가 있다.(11,12) 따라서 본 연구는 혈관 평활근세포에 대하여 증식억제능력이 확인된 MPA와 RPM가 사구체 경화에 중요한 역할을 하는 사구체 혈관간세포의 증식에 미치는 효과 및 약제의 단독 및 병합투여를 통해 검색하였다.

MPA가 혈관 평활근세포의 증식을 억제함은 많은 보고에서 확인된 바가 있으며,(6,7,13) 이 제제는 임상적으로도 급성거부반응과 무관하게 만성 이식신 신증의 빈도를 낮출 수 있다고 보고된 바 있다.(14) 또한 MPA가 사구체 혈관간세포의 증식을 억제함이 보고되고 있어,(15,16) 이를 근거로 MPA는 임상에서 증식성 사구체 신증의 치료에 사용되기도 한다.(17) 저자들은 MPA를 100 nM부터 10 μ M까지의 농도를 본 실험에 적용하였는데 이는 효과적인 면역억제능력을 보이는 MPA의 사용농도를 감안하여 설정한 것으로,(18) 500 nM 이상의 MPA는 사구체 혈관간세포의 증식을 효과적으로 억제하였다. 이는 임상적으로 사용가능한 MPA의 적정농도 내에서 사구체 혈관간세포의 증식이 충분히 억제될 수 있음을 의미하며, 이러한 농도는 MPA가 혈관 평활근세포의 증식을 억제하는 농도와도 비슷한 수준이었다.

RPM은 본 실험 최고농도인 10 nM에서만 유의한 증식억제효과를 보였으나, RPM의 농도가 증가함에 따른 농도의 존적인 증식억제효과를 관찰할 수 있었다. 혈관 평활근세포에 대한 증식억제 실험에서 1 nM 이상의 RPM에서 충분한 세포증식이 억제되었음(11)을 감안한다면 사구체 혈관간세포의 증식억제효과는 혈관 평활근세포보다 고농도의 RPM이 필요함을 알 수 있으며 10 nM 이상의 RPM에서 비로소 50% 이상의 증식억제효과가 기대된다. 현재까지 알려진 바로는 RPM의 농도가 15 ng/ml (16.4 nM) 이상인 경우 골수독성과 지질장애가 심해진다고 보고되고 있으나,(19) 흰쥐를 이용한 동물실험에서는 27 ng/ml (29.5 nM)에서도 신장의 병적 소견이 없는 것으로 보고되고 있다.(20) 일반

적으로 인정되는 RPM의 유효농도가 10~60 ng/ml (10.9~65.6 nM)라는 사실(21)을 고려한다면 10 nM 이상 농도의 RPM은 임상적으로 충분히 사용이 가능한 농도라 할 수 있다. 실제로 10 nM 이상의 RPM에서 사구체 혈관간세포의 증식이 50% 이상 억제됨이 최근 보고되기도 하였다.(22)

초기 임상적용에서 RPM은 cyclosporine이나 tacrolimus와 같은 calcineurine 억제제와 병합 투여하였으나, 이는 RPM의 약역동학적인 변화를 초래하였다.(22,23) 따라서 최근에는 RPM을 사용함에 있어서 calcineurine 억제제를 배제한 새로운 면역억제제 조합이 많이 시도되고 있으며, MPA와 RPM의 병합투여는 새로운 면역억제제 조합으로 많이 시도되고 있다.(24,25) 본 연구에서는 비록 RPM의 실험농도가 충분치 않아 50% 이상의 증식억제효과를 확인할 수는 없었으며 병합투여 시 RPM보다는 MPA의 농도에 따라서 세포의 증식이 억제되는 소견을 보였다. 그러나 MPA와 RPM의 농도와 증식정도를 다중회귀분석 한 결과 각각의 약제가 일정하고 독립적인 증식억제능력을 보이고 있음을 관찰할 수 있었다. 즉 병합투여는 부가적이거나 부정적인 상호작용이 없었으며, 각각 약제가 독립적으로 증식억제효과를 보임을 알 수 있었다.

결론적으로 MPA와 RPM은 단독 또는 병합투여 시 독립적으로 사구체 혈관간세포의 증식을 억제하며, 이러한 혈관간세포 증식억제효과는 혈관 평활근세포의 증식억제와 더불어 신장이식 후 발생하는 만성 이식신 신증의 예방과 치료에 MPA와 RPM의 사용이 유용하다는 실험적인 근거를 제시하고 있다.

REFERENCES

- 1) Häyry P, Isoniemi, Yilmaz S. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev* 1993;134:33-46.
- 2) Kashgarian M, Sterzel RB. The pathology of the mesangium. *Kidney Int* 1992;41:524-9.
- 3) McDonald PC, Wong D, Granville DJ, McManus BM. Emerging roles of endothelial cells and smooth muscle cells in transplant vascular disease. *Transplant Rev* 1999;13:109-27.
- 4) Park J-S. Inhibition of intimal hyperplasia. *J Korean Vasc Surg* 1999;15:365-74.
- 5) Häyry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtchenkov M, Aavik E. Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 2000;32:519-20.
- 6) Gregory CR, Huang X, Pratt RE, Dzau VJ, Shorthouse R, Billingham ME, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995;59:655-61.
- 7) Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS61443 on functional and morpho-

- logical changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995;59:460-6.
- 8) Mohacsi PJ, Tueller D, Hulliger B, Wijngaard PLJ. Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:484-92.
 - 9) Becker GJ, Perkovic V, Hewitson TD. Pharmacological intervention in renal fibrosis and vascular sclerosis. *J Nephrol* 2001;14:332-9.
 - 10) Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effects of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 1991;39:1255-66.
 - 11) Park J, Ha H, Kwon KH, Kim MS, Yoon C-S, Seo J, et al. Effects of mycophenolic acid, rapamycin, and carvedilol on the PDGF-induced fibronectin secretion by rat vascular smooth muscle cells: Implication of MAP kinase. *J Korean Soc Transplant* 2002;16:1-8.
 - 12) Kim YS, Kim MS, Ha H, Park J, Kim HJ, Park K. Effects of carvedilol alone and in the presence of cyclosporine A on the DNA synthesis of cultured vascular smooth muscle cells. *Surg Today* 2002;32:230-5.
 - 13) Park J, Ha H, Kim MS, Seo J, Kim HJ, Park K, et al. Effect of mycophenolic acid on human vascular smooth muscle cell proliferation and its signal transduction. *J Korean Surg Soc* 2002;62:1-7.
 - 14) Ojo AO, Meier-Kriesche H-U, Hanson JA, Leichtman AB, Cibrik D, Magee JC, et al. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000;69:2405-9.
 - 15) Ziswiler R, Steinmann-Niggli K, Kappeler A, Daniel C, Marti H-P. Mycophenolic acid: A new approach to the therapy of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2055-66.
 - 16) Hauser IA, Renders L, Radeke H-H, Sterzel B, Goppelt-Struebe M. Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:58-63.
 - 17) Briggs WA, Choi MJ, Scheel PJ. Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 1998;31:213-7.
 - 18) Allison AC, Eugui EM. Inhibitors of De Novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 1993;25(Suppl 2):8-18.
 - 19) Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Meier-Kriesche H-U, Van Buren CT. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:1040-6.
 - 20) DiJoseph JF, Mihartsch MJ, Sehgal SN. Renal effects of rapamycin in the spontaneously hypertensive rat. *Transplant Int* 1994;7:83-8.
 - 21) DiJoseph JF, Fluhler E, Armsrong J, Sharr M, Sehgal SN. Therapeutic blood levels of sirolimus (rapamycin) in the allografted rat. *Transplantation* 1996;62:1109-12.
 - 22) Wang W, Chan YH, Chan L. Effect of rapamycin and FK506 on mesangial cell proliferation. *Transplant Proc* 2001;33:1036-7.
 - 23) Kaplan B, Meier-Kriesche H-U, Napoli KL, Kahan BD. The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:48-53.
 - 24) Groth CG, Bäckman L, Jose-Maria M, Calne R, Kreis H, Lang P, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation. *Transplantation* 1999;67:1036-42.
 - 25) Kreis H, Cisterne J-M, Land W, Wramner L, Squifflet J-P, Abramowicz A, et al. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000;69:1252-60.