



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 610**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06825898 .7**
96 Fecha de presentación : **12.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948216**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Tratamiento de la insuficiencia renal aguda con trombomodulina soluble.**

30 Prioridad: **13.10.2005 US 726376 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2011

73 Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US
Indiana University Research and Technology
Corporation

72 Inventor/es: **Grinnell, Brian, William;**
McKinney, Thurman, Dwight y
Molitoris, Bruce, A.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la insuficiencia renal aguda con trombomodulina soluble

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la ciencia médica, particularmente a la prevención y al tratamiento de la insuficiencia renal aguda con trombomodulina soluble.

Antecedentes de la invención

10 La insuficiencia renal aguda (IRA) adquirida en el hospital sigue estando asociada con una alta mortalidad a pesar de los avances técnicos en la asistencia a estos pacientes y mejoras de nuestros conocimientos sobre la fisiopatología del proceso patológico. Durante las últimas 4 décadas, la tasa de mortalidad ha permanecido constante y es superior al 40-70%. Esto es especialmente cierto en el contexto de la UCI, en el que la IRA está asociada con una mortalidad del 50-90% (Conger JD. AmJKidDis 1995; 26:565-76; Liano F, Pascual J. Semin Nephrol 1998; 18:541-50; McCarthy JT, Mayo Clin Proc 1996; 71(2): 17-26; Anderson RJ y col., N Engl J Med 1977; 296(20):1134-8). Por tanto, la prevención de la IRA mejorará la mortalidad y reducirá la morbilidad, la duración de la estancia en el hospital y los costes globales.

15 En numerosos modelos experimentales se ha demostrado que una variedad de agentes, incluidos dopamina, agentes osmóticos, el péptido natriurético atrial, el factor de crecimiento similar a la insulina y antagonistas del receptor endotelial, aunque son eficaces en animales, se ha descubierto que son ineficaces en estudios clínicos de IRA (Solomon y col. N. Engl. J. Med. 1994; 151:208-60; Allegren y col. N. Engl.J.Med. 1997; 336:828-34; Hirschberg y col. Kidney Int. 1999; 55(6):2423-32; Brinkmann y col. J. Biol. Chem. 2002 14; 277(24):21453-7).

20 Por tanto, sigue habiendo la necesidad de terapéuticas para tratar la IRA en seres humanos.

La trombomodulina (TM) es una glicoproteína presente en la superficie de la membrana de las células endoteliales en muchos órganos, incluidos los pulmones, el hígado y los riñones. La proteína C actividad (PCA) se genera mediante la escisión mediada por trombina de la PC, un acontecimiento que requiere TM como cofactor de la trombina (Esmon, y col., J Biol Chem 257: 7944-7947, 1982; Esmon y Owen, Proc Natl Acad Sci USA 78: 2249-2252, 1981). Cuando la trombina forma complejo con la TM in vivo, la activación de la proteína C (PC) se multiplica por 1000 (Huang, y col., J Biol Chem 278: 46750-46759, 2003), y se multiplica además por 20 cuando la PC está unida al receptor de PC de la célula endotelial (ECPCR) (Esmon, Crit Care Med 32: S298-301, 2004). La PCA formada de este modo ejerce un efecto anticoagulante inactivando los factores Va y VIIIa, de modo que regula la cascada de coagulación. Recientemente se ha demostrado que la PCA protege contra la lesión isquémica renal (Mizutani, y col., Blood 95: 3781-3787, 2000). La lesión isquémica conduce a la liberación de muchas citocinas que disminuyen la regulación de la expresión de la TM, de modo que produce un estado de deficiencia relativa de TM y deja a la microvasculatura en un estado de pro-coagulante ((Ikeguchi, et al., Kidney int. 61: 490-501, 2002). Se supone que esta insuficiencia relativa de TM se produce durante y después de la lesión isquémica por hipoxia, estrés, TNF-alfa y otros varios factores que empeoran adicionalmente la lesión microvascular (Van de Wouwer and Conway, Crit Care Med 32: S254-261, 2004). Aparte de su papel en el sistema de la PC, ahora se ha establecido que la TM posee papeles en la inflamación, la fibrinólisis, la apoptosis, la adhesión celular y la proliferación celular (Conway, y col., J Exp Med 196: 565-577, 2002; Huang y col., J Biol Chem 278: 46750-46759, 2003). Por tanto, el uso de una trombomodulina soluble ofrece un enfoque potencialmente significativo de la prevención y tratamiento de la IRA isquémica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una

1. trombomodulina soluble para usar en el tratamiento de un sujeto humano que tiene insuficiencia renal aguda, en el que dicha trombomodulina soluble es una variante secretada y soluble de la trombomodulina que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático de la trombomodulina de longitud completa y, opcionalmente, también carece del dominio ST.

2. trombomodulina soluble para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insuficiencia renal aguda es el resultado de una lesión inflamatoria o isquémica.

3. trombomodulina soluble para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insuficiencia renal aguda se debe a necrosis tubular aguda resultante de isquemia renal.

50 4. trombomodulina soluble para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insuficiencia renal aguda se debe a nefritis intersticial aguda.

Descripción detallada de la invención

Para los fines de la presente invención, tal como se divulga y reivindica en el presente documento, los términos siguientes son como se define a continuación.

5 IRA se refiere a insuficiencia renal aguda debida a necrosis tubular aguda o a nefritis intersticial aguda. La IRA se produce cuando hay una reducción aguda de la tasa de filtración glomerular asociada con la retención de residuos nitrogenados. Como alternativa, la insuficiencia renal aguda se puede denominar disfunción renal aguda.

PCA se refiere a la proteína C activada o PCa se refiere a PCa recombinante. PC incluye y es, preferentemente, PCa humana recombinante, aunque PCa puede también incluir otras especies que tienen actividades proteolítica, amidolítica, estereolítica y biológica (anticoagulante, antiinflamatoria o profibrinolítica de la proteína C).

10 TMs se refiere a la trombomodulina soluble, que es una variante secretada y soluble de la trombomodulina que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático de la trombomodulina de longitud completa. La estructura primaria de aminoácidos de la trombomodulina se conoce en la técnica, tal como se describe en el documento EP 0412841 A1. La TM humana se sintetiza como una proteína de 575 aminoácidos en la que se incluye una porción de péptido señal con una longitud comunicada de 16, 18 o 21. Tras la porción del péptido señal, la TM humana
15 comprende los siguientes dominios o regiones, secuencialmente desde el extremo amino: 1) un dominio amino terminal de 222-226 aminoácidos), 2) seis estructuras de tipo EGF ("factor de crecimiento epidérmico") de ~ 236-240 aminoácidos, 3) un dominio rico en serina/treonina (dominio ST) de ~ 34-37 aminoácidos y que tiene varios posibles sitios de O-glicosilación, 4) una región transmembrana de ~23-34 aminoácidos y 5) un dominio citoplasmático de ~ 36-38 aminoácidos. En el contexto de la presente invención, la TMs también incluye un derivado
20 de trombomodulina que además carece del dominio ST. Ambas formas de TMs poseen actividad de trombomodulina, como se describe a continuación. Como se usa en el presente documento, la TMs es, preferentemente, TMs recombinante, y, más preferentemente, TMs recombinante humana.

Cantidad farmacéuticamente eficaz se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto farmacéutico. Por supuesto, será el médico encargado de la atención quien determine la dosis concreta del
25 compuesto administrado de acuerdo con la presente invención evaluando las circunstancias concretas que rodean el caso, incluido el compuesto administrado, la afección concreta que se esté tratando, las características del paciente y consideraciones similares.

La infusión continua se refiere continuar de forma sustancialmente ininterrumpida la introducción de una solución o suspensión en una vena durante un periodo de tiempo especificado.

30 Inyección en bolo se refiere a la inyección de un fármaco en una cantidad definida (denominada bolo) durante un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 120 minutos.

LIR se refiere a lesión isquémica por reperusión.

Tratar describe la gestión y la atención de un paciente con el fin de combatir una enfermedad, afección o trastorno para eliminar la enfermedad, afección o trastorno, o profilácticamente para prevenir el inicio de los síntomas o
35 complicaciones de la enfermedad, afección o trastorno.

La actividad de la trombomodulina se refiere a cualquier propiedad de la trombomodulina soluble o sus derivados responsables de la interacción de la proteína C, la unión a la trombina, la interacción con el EPCR, que tiene unión a HMGB1 y muestra propiedades biológicas de la actividad cofactor de la PCA, la actividad inhibidora de la trombina y la actividad antiinflamatoria. Los procedimientos para someter a ensayo las actividades de unión y funcionales de la TM son bien conocidos en la técnica, es decir véase Parkinson, y col., 1990 J. Biol. Chem. 265: 12602-12610; Grinnell y Berg. 1996. Am. J. Physiol. 270: H603-609; Gerlitz, y col. 1993 Biochem. J. 295: 131-140; Abeyama y col.,
40 2005, J. Clin. Invest. 115:1267-1274.

PAP se refiere pinzamiento aórtico parcial.

La presente invención proporciona el tratamiento y/o la prevención de insuficiencia renal aguda con trombomodulina soluble. Anteriormente se pensaba que la mortalidad por insuficiencia renal aguda estaba relacionada únicamente
45 con la enfermedad subyacente, aunque en estudios recientes se indica que la insuficiencia renal per se es un factor de riesgo independiente de mortalidad (Levy EM y col JAMA 1996;275(19): 1489-94; Chertow GM y col. Am J Med 1998;104(4):343-8). Sin embargo, la IRA que se produce secundaria a otra enfermedad tiene una mortalidad mayor y peor resultado a largo plazo que la IRA que se produce de novo (IRA primaria).

50 Se ha encontrado una diversidad de agentes en modelos experimentales que son eficaces en animales pero ineficaces en los estudios clínicos Solomon y col. N Engl J Med 1994; 151:208-60; Allegren y col. NEnglJMed 1997;336:828-34; Hirschberg y col. Kidney Int 1999;55(6):2423-32; Brinkmann y col. J Biol Chem 2002 14;277(24):21453-7). Varios factores contribuyen a estos resultados clínicos negativos. En primer lugar, la IRA

humana es un trastorno complejo resultante de factores patogénicos heterogéneos. Por tanto, no es probable que apuntar a una vía fisiopatológica selectiva con un agente selectivo sea beneficioso. También se han producido fallos a causa del fracaso de aplicar un tratamiento basado en nuestros conocimientos de la fisiopatología de la lesión renal aguda, especialmente el papel de inflamación. Además, la ventana terapéutica parece ser estrecha de modo que es necesario el inicio precoz de la terapia. Por desgracia, nuestros marcadores biológicos actuales de IRA, creatinina sérica y BUN (nitrógeno ureico en sangre) son malos marcadores indirectos de lesión y disfunción renal, incluida la tasa de filtración glomerular (TFG). Este escenario aumenta con el hecho de que una TFG precisa es extremadamente difícil de medir e interpretar en condiciones de estado inestable. Además, una vez que se pueden detectar los cambios en BUN y creatinina, la IRA significativa ya se ha producido y puede estar más allá de la ventana terapéutica.

Las estrategias actuales para minimizar la aparición de la lesión de insuficiencia renal aguda y limitar su extensión en pacientes de alto riesgo han tenido éxito para ciertas causas de IRA. Es muy importante el hecho de la incidencia de nefropatía por radiocontraste se ha reducido considerablemente. No obstante, cuando la IRA se produce en pacientes de alto riesgo previamente tratados, sigue portando un incremento de cinco veces la mortalidad en comparación con poblaciones de pacientes equivalentes (Levy EM y col. JAMA 1996;275(19):1489-94). Además, puntuaciones clínicas que incorporen factores de riesgo para predecir la IRA ayudarán a identificar a los pacientes que potencialmente podrían beneficiarse de agentes terapéuticos administrados como pretratamiento (Tharar CV y col. J. Am. Soc. Nephrol 16:162-168, 2005). Los conocimientos actuales de los inventores sobre la fisiopatología de la IRA se basan en estudios extensos en los que se identifican mecanismos celulares y moleculares de insuficiencia renal aguda (Bonventre JV y Weinberg JM J. Am. Soc. Neph 14:2199-2210, 2003). La disfunción y lesión de células endoteliales y epiteliales son características de la IRA. Actualmente, datos recientes han identificado la inflamación, especialmente interacciones endotelio-WBC, como un aspecto central del daño renal durante las fases de inicio y de extensión de la IRA (Molitoris Y Sutton, Kidney Inter. 66:496-499, 2004.). La disfunción de células endoteliales y las interacciones células endoteliales-inflamatorias, incluidos neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos T, han recibido una atención considerable como importantes factores que contribuyen a la insuficiencia renal aguda isquémica. La infiltración precoz de células inflamatorias conduce a lesión microvascular, inflamación, incremento de la permeabilidad microvascular, coagulación, apoptosis y necrosis adicionales. Recientemente, la intervención precoz para limitar la inflamación ha recibido un considerable interés como estrategia protectora en la prevención de la insuficiencia renal aguda. Varios compuestos nuevos parecen ser eficaces en la reducción de la lesión por isquemia-reperfusión mediante acción directa sobre los leucocitos (Ortiz, y col., Transplant Proc 2003;35(4):1571-4; Day, y col., J Clin Invest 2003;112(6):883-91, Okusa, y col., Kidney Int 2001; 59: 2114-25; Cremer, y col. Ann Thorac Surg 1996;61(6):1714-20). Otras dianas de la intervención terapéutica incluyen vasodilatación, potenciación de la reparación celular y de la diferenciación celular. Aunque se ha demostrado que otros compuestos nuevos adicionales son eficaces en estudios preclínicos, muchos de estos agentes interrumpen las dianas posteriores que pueden no ser eficaces en un trastorno complejo tal como la insuficiencia renal aguda.

La complejidad de la lesión renal aguda se debe, en parte, a la activación de múltiples vías tanto solapantes como claras temporales. La disfunción y la inflamación endotelial (celular y humoral) son mediadores clave de la IRA. Es improbable que apuntar a acontecimientos que se producen tardíamente en el proceso de la ira reduzca de forma eficaz la lesión renal aguda. Por tanto, nuevas estrategias para tratar o prevenir la lesión renal aguda requerirán compuestos dirigidos a vías proximales. Dichas estrategias podrían incluir el uso de compuestos que afecten ampliamente a múltiples vías o terapias de combinación dirigidas a varias áreas en lugar de a un único foco fisiopatológico.

Un ejemplo particularmente ilustrativo de la IRA es tras cirugía cardíaca. Dos procesos principales contribuyen a la IRA tras cirugía cardíaca: 1) circulación extracorpórea (CPB) y 2) lesión por isquemia-reperfusión (LIR). La circulación extracorpórea (CPB) provoca un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (Faymonville, y col. J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102(2):309-17; Frering, y col., J Thorac Cardiovasc Surg 1994;108(4):636-41). El contacto de componentes de la sangre con la superficie artificial del circuito de derivación, la lesión por isquemia-reperfusión, la endotoxemia, el traumatismo operatorio, el flujo sanguíneo no pulsátil y la disfunción ventricular izquierda preexistente son, todos ellos, posibles causas de SRIS en este contexto (Paparella, y col., Eur J Cardiothorac Surg 2002;21(2):232-44; Musial, y col., J Lab Clin Med 1985;105(4):514-22; Kirklin, y col., J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 86(6):845-57; Tennenberg y col., Ann Thorac Surg 1990;50(4):597-601). En su forma más grave se puede observar un espectro de lesiones que incluye una o más de las manifestaciones clínicas siguientes: pulmonar, renal, intestinal, del sistema nervioso central y disfunción miocárdica; coagulopatía; vasodilatación e incremento de la permeabilidad capilar; hemólisis; pirexia e incremento de la susceptibilidad a la infección (Paparella, y col., Eur J Cardiothorac Surg 2002; 21 (2):232-44.). Durante la CPB, están activados tanto los neutrófilos como el endotelio vascular (Asimakopoulou, y col., Ann Thorac Surg 1998;66(6):2135-44; Galinanes, y col., Circulation 1996;94(9Suppl):II364-9). Las plaquetas también experimentan activación, desgranulación y adherencia al endotelio vascular (Zilla y col., J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 97(3):379-88). Estos acontecimientos conducen a la elaboración de radicales libres derivados de oxígeno citotóxico (Haga y col. Artif Organs

1993;17(10):837-42), proteasas (Faymonville y col., J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102(2):309-17), citocinas (Frering y col., J Thorac Cardiovasc Surg 1994;108(4):636-41) y quimiocinas (Paparella y col., Eur J Cardiothorac Surg 2002;21(2):232-44). Estos mediadores inflamatorios, tales como interleucina (IL)-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, muestran un considerable aumento de los niveles séricos durante la CPB y, en general, alcanza niveles máximos de 2 a 4 horas después de la finalización de la inflamación en la lesión por isquemia-reperfusión (LIR) iniciada por isquemia seguida por una activación pronunciada de las células inflamatorias, células endoteliales y células epiteliales. Como resultado, estos tejidos diana (células endoteliales, monocitos en circulación y macrófagos fijados al tejido) liberan citocinas y radicales libres derivados de oxígeno que además dirige la respuesta inflamatoria (Jansen y col., Ann Thorac Surg 1992;54(4):744-7; discusión 7-8). A pesar de los esfuerzos para producir un sistema de CPB que no produzca activación por contacto de los componentes de la sangre, este objetivo no se ha conseguido y la CPB sigue siendo un potente estímulo proinflamatorio que a menudo conduce a la aparición de IRA.

La presente invención contempla tanto el uso de TMs o derivados de la misma para la prevención de insuficiencia aguda renal en pacientes de alto riesgo, así como el tratamiento de la insuficiencia renal aguda resultante de lesión inflamatoria o isquémica. Los pacientes en alto riesgo incluyen aquéllos con enfermedad renal crónica, hepatopatía o cardiopatía subyacente y diabetes que, después, experimentan necrosis tubular aguda o nefritis intersticial aguda.

La TM soluble y sus derivados son útiles para la prevención y el tratamiento de la necrosis tubular aguda resultante de isquemia renal tras un traumatismo o hemorragia importante, parada cardíaca, derivación cardíaca, shock séptico, quemaduras o cualquier flujo sanguíneo renal interrumpido durante la cirugía. Además, la TM soluble y sus derivados serán útiles tras lesión química por fármacos nefrotóxicos, tromboembolia, hipertensión maligna, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), síndrome urémico hemolítico (SUH), vasculitis, reacción a transfusión, agentes quimioterapéuticos, toxinas y venenos, colorantes de radiocontraste en pruebas de imagen hipertensión maligna y trastornos resultantes del nacimiento. La TM soluble y sus derivados también serán útiles para el tratamiento de la nefritis intersticial aguda causada por inflamación del tejido renal intersticial tras infección o en enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, tales como lupus, leucemia, linfoma y sarcoidosis, y tras lesión renal en respuesta a antibióticos y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos).

Anteriormente se han descrito procedimientos para producir trombomodulina soluble humana recombinante (Parkinson y col. 1990 J. Biol. Chem. 265: 12602-12610; documento EP 0412841 A1).

La TMs se administra a un sujeto que lo necesite usando técnicas convencionales de administración parenteral periférica, incluyendo las vías de administración preferidas la inyección intravenosa y/o subcutánea. Más preferentemente, la TMs se administrará mediante bolo IV y/o inyección subcutánea usando una dosis adecuada para exposición variable de una a veinticuatro o más horas, incluidas, entre otras, 48, 72, 96 o incluso 120 horas. La preparación de una preparación farmacéutica aceptable de la TMs usada en la presente invención, incluida su concentración, excipientes, pH, isotonicidad, presentación, forma de dosificación y similares, es bien conocido para el experto en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas para usar en la presente invención deberán ser adecuadas para el modo de administración seleccionado y se usarán excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizadores y similares según sea adecuado. La última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA proporciona un compendio de técnicas de formulación tal como son conocidas, en general, para aquéllos que practican la técnica. Las preparaciones farmacéuticas para usar en la presente invención deberán ser estériles o, al menos, casi estériles, y, en caso necesario, tendrán conservantes o serán bacteriostáticas.

La TMs se usará junto con la atención de referencia, incluidas, entre otras, antibióterapias adecuadas para tratar o prevenir infecciones, diuréticos para el tratamiento de fluidos, furosemida o manitol, dopamina, péptido natriurético atrial (PNA), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes del receptor de angiotensina, diálisis, eritropoyetina y tratamiento de la hipopotasemia, acidosis y desequilibrio de potasio con kayexalato, calcio, glucosa/insulina y/o diuréticos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, la invención. Los ejemplos describen experimentos realizados en ratas, por tanto el uso de TMs de rata es satisfactorio. No obstante, en los procedimientos de tratamiento de la invención destinados para uso humano se prefiere la TMs humana recombinante.

Ejemplo 1

Preparación y análisis de TMs de rata

Anteriormente se han descrito procedimientos para producir trombomodulina soluble humana recombinante (Parkinson y col. 1990 J. Biol. Chem. 265: 12602-12610.) Para estudios en ratas, la trombomodulina soluble

análoga de rata se produce del siguiente modo: La trombomodulina de rata de longitud completa se amplifica con PCR a partir de una biblioteca de pulmón de rata de Clontech 5'-stretch más ADNc y TA clonado en pCRII-TOP usando el kit de clonación TOPO de Invitrogen usando los cebadores siguientes: Cebador 5' para la TM de rata de longitud completa,

5 5' - CGGTCTAGACCTGACCACCATGCTTGGGGTTTTCCTTCTGG - 3'; cebador para la TM de rata de longitud completa,

5'-GATGAGGTCGACGATATCTCA GAACTTCTGCAGCGTCCG - 3'. Tras la confirmación de la secuencia para el ADNc de TM de rata de longitud completa se usan los cebadores siguientes para amplificación en PCR y clonación de la TM soluble (TMs) de rata en el vector de expresión transitoria de mamífero XenoFLIS-PP-Fc, que comprende el promotor de CMV, el péptido señal preprotripsina, líder de Xenopus y BGH poli-A:

Cebador 5' para TMs de rata, 5' - CCCAGGCTTCGACTAGCCAAGCTGCAGCCC - 3'; cebador para TMs de rata, 5' -CCGCTCGAGTCAAGAGTGCAGTGGCCTGGC - 3'. Los constructos de TMs de rata no incluyen el dominio ST ya que están truncados en 4 aminoácidos después de EGF6. Por tanto, la proteína purificada resultante no tiene un resto condroitín sulfato (CS-).

15 Tras la confirmación de la secuencia, el vector de expresión de TMs de rata se purifica y usar para una expresión transitoria a gran escala en células HEK293E. El medio acondicionado se concentra y aclara mediante filtración. La conductividad del medio acondicionado concentrado y aclarado se ajusta a 10 mS mediante la adición de H₂O, antes de cargar en una columna de sefrosa Q de flujo rápido (Amersham Biosciences), equilibrada en tampón (Tris 20 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 50 mM, EDTA 5 mM y benzamidina-HCl 5 mM). Después de cargar, la columna se lava con 3 volúmenes del lecho del mismo tampón antes de la elución con un gradiente lineal de NaCl de 50 mM a 1 M. Las fracciones que contienen trombomodulina (mediante SDS-PAGE) se combinan y se ajusta el pH a 4,5, antes de la diálisis en fosfato sódico 20 mM, pH 4,5, que contiene EDTA 5 mM y benzamidina-HCl 5 mM. A continuación, la proteína combinada se aclara mediante centrifugación y se carga en una columna de sefrosa (Amersham Biosciences) equilibrada en fosfato sódico 20 mM, pH 4,55). La trombomodulina de rata, que esté presente en el flujo continuo de la columna, se recolecta, se concentra y se purifica también mediante cromatografía de exclusión en gel usando una columna Superdex S200 50/60 (Amersham Biosciences) en PBS (fosfato sódico 10 mM, Ph 7,4, que contiene NaCl 150 mM). Las fracciones que contienen trombomodulina de rata purificada se combinaron y se esterilizaron mediante filtración usando un filtro de 0,2 µm (Millipore). La concentración de proteína se determina mediante A280, usando un coeficiente de extinción de 1,1 (mg/ml)⁻¹ cm⁻¹. Se usan espectrometría de masas MALDI y secuenciación del N terminal para confirmar la identidad y la pureza de la trombomodulina de rata. Los niveles de endotoxina de TMs de rata preparada de este modo fueron inferiores a 5 UE/mg de proteína purificada.

Ejemplo 2

Modelo de pinzamiento aórtico parcial en roedores

35 Ratitas macho Sprague-Dawley de 200-250 g de peso se adquieren en Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Las ratas se estabulan en condiciones estándar de laboratorio y se alimentan con un pienso para ratas a base de aceite de maíz al 10% y agua corriente a demanda. Se permitió a las ratas un mínimo de 3 días de periodo de aclimatación antes de comenzar los protocolos experimentales. La noche antes de la cirugía no se permitió a las ratas acceder al alimento, pero sí tenían acceso al agua. Se induce anestesia con 5% de halotano y se mantuvieron con 1-1,5% de halotano en aire enriquecido con oxígeno a través de una mascarilla. Después de afeitar el abdomen de la rata se hace una incisión en la parte central a través de la piel y la musculatura para exponer la cavidad abdominal. A continuación se aísla la aorta abdominal justo debajo de las arterias renales a través de una disección directa desde la vena cava inferior y se coloca y fija una sonda ultrasónica (de 2,0 mm de diámetro, Transit Time Perivascular Flowmeter TS420 (Transonic Systems, Inc, Ithaca, NY) para cuantificar la velocidad del flujo de sangre aórtico. Después, se aísla la aorta abdominal superior a través de una disección directa y se libera de las estructuras adyacentes para exponer la aorta entre la arteria celíaca y la arteria mesentérica superior (AMS).

La propia pinza aórtica está compuesta por dos tubos de polietileno de 4 mm de longitud (PE-100, diámetro de 0,86 mm, Clay Adams Co, Parsippany, NJ) y una sutura de seda estándar 3.0 de 25,4 cm. El hilo para sutura de seda se pasa primero debajo de la aorta y por encima de la región mencionada. A continuación, la primera pieza del tubo se pasa sobre ambos extremos del hilo para terminar descansando sobre la aorta entre la celíaca y la AMS. Después, se ata el hilo de seda para dejar un nudo no fijado. La segunda pieza del tubo se coloca después en el lazo, perpendicular y sobre el primero. Después, el hilo de seda se ata y la tensión sobre los dos extremos del hilo aumenta hasta que hay una reducción del 90% de la velocidad del flujo sanguíneo aórtico inicial, tal como se mide en el lector de la sonda ultrasónica. Esta velocidad del flujo sanguíneo aórtico inicial se registra antes de la colocación de los tubos. Por tanto, se mantienen un flujo sanguíneo basal del 10% durante 60 minutos. Las ratas se mantienen en una manta de calentamiento a lo largo del procedimiento para mantener la temperatura corporal de

37°C.

Una vez completada la cirugía, todas las ratas de todos los experimentos reciben 2 ml de solución salina caliente por vía intraperitoneal para sustituir las pérdidas de volumen sanguíneo e insensibles producidas durante la cirugía. Las ratas se recuperan rápidamente de la anestesia y se monitorizan en jaulas con mantas calientes durante 4-6 horas tras la operación. Posteriormente vuelven a sus jaulas, con acceso libre a alimento y agua y con atención de acuerdo con las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee Review Board, que también aprobó los procedimientos anteriores.

El análisis histopatológico se realiza en una serie de ratas 24 horas después del PAC. Antes de la recolección, los riñones se prefunden brevemente a través de la aorta abdominal con solución salina tamponada con fosfato (PBS) caliente y después se conservan mediante perfusión in vivo con una solución al 4% de paraformaldehído (PFA). En todas las ratas se extraen ambos riñones, se cortaron en láminas sagitales y se sumergen en PFA durante la noche a 4°C. Después, las secciones se introducen en parafina y se realiza una tinción histológica con hematoxilina-eosina (H y E) o ácido peryódico de Schiff (PAS). La graduación histológica para determinar la gravedad del daño tisular evaluado por la extensión del desprendimiento de células tubulares, pérdida del borde en cepillo del túbulo proximal, formación de cilindros, dilatación tubular y obstrucción es realizada por un anatomopatólogo renal (C.L.P.) ciego para el estudio. También se evalúan las puntuaciones de necrosis tubular como se han descrito previamente (Jablonski, y col., Transplantation 35: 198-204, 1983) para el daño tubular proximal cortical y (Kelly, y col. J Clin Invest 97: 1056-1063, 1996) para el daño tubular de la médula externa.

La microscopia *in vivo* de dos fotones se realiza tal como se ha realizado anteriormente (Dunn, y col., J Physiol Cell Physiol 283: C905-916, 2002; Sutton, y col., Kidney Int 62: 1539-1549, 2002). Un total de 6 ratas macho Sprague-Dawley se someten al modelo PAC y se realizan pruebas de imagen renal in vivo a 24 horas usando un escáner Bio-Rad MRC-1024MP Laser Scanning Confocal/Multiphoton (Hercules, CA) con una longitud de onda de excitación de 800 nm a través de un microscopio invertido Nikon diaphot utilizando una lente 60 x NA 1.4. Se inserta un catéter venoso femoral para disponer de un acceso vascular para inyectar los colorantes antes de la prueba de imagen. La evaluación de la lesión renal funcional en forma de defectos en la permeabilidad vascular y alteraciones en el flujo sanguíneo y de orina se realiza usando una tinción nuclear (Hoechst-33342, 400 µl, 1,5 mg/ml en 0,9% de solución salina; Molecular Probes, Eugene, OR), un dextrano de alto peso molecular (DAPM) que no es filtrado por el glomérulo en condiciones normales (500.000 Da, 7,5 mg/ml en 0,9% de solución salina, Molecular Probes, Eugene, OR) y un dextrano de bajo peso molecular (DBPM), que se filtra con libertad (3.000 Da, 20 mg/ml en 0,9% de solución salina; Molecular Probes, Eugene, OR). Para diferenciar los dos dextranos, el dextrano DAPM se marca con fluoresceína (Molecular Probes, Eugene, OR), mientras que el DBPM se marca con rojo Texas (Molecular Probes, Eugene, Oregón). El riñón izquierdo de la rata anestesiada se somete a prueba de imagen tras exteriorización a través de una ventana retroperitoneal a través de una incisión en el flanco. Las imágenes se analizan con el software Metamorph (Universal Imaging, West Chester, PA). Se recogen aproximadamente 10-12 imágenes cada 3 minutos para cada animal analizado. Para los estudios que investigan los leucocitos en la microvasculatura, las imágenes obtenidas se analizan en una malla de 4 x 4. Los leucocitos se identifican por sus características para captar la tinción nuclear de Hoechst. Esto se correlaciona con la microvasculatura y solo se cuentan los leucocitos presentes en la propia microvasculatura. Los leucocitos en la microvasculatura se clasifican en 3 subtipos, a saber (i) de flujo libre, rápida aparición y desaparición durante las pruebas de imagen en tiempo real en una malla para menos o igual a 2 marcos, (ii) estático o adherente, fijados al endotelio microvascular sin movimiento y (iii) en rodamiento- aparecen a lo largo de la superficie del endotelio para 3 o más marcos en una malla.

Todos los análisis estadísticos de las muestras de plasma y los pesos diarios usan la prueba t de Student de dos muestras, dos colas no pareados de significación y regresión lineal cuando sea adecuado. Todos los datos en el texto y las figuras aparecen como la media $\pm$ dos desviaciones estándar de la media. Los valores P se consideran significativos si son inferiores a 0,05 para todas las comparaciones. El análisis se realiza usando el software estadístico de Microsoft Office Excel 8.0, así como EPIINFO v6.0 (CDC, Atlanta, GA).

Ejemplo 3

Efecto de la TMs tras isquemia renal.

Se realiza un estudio para desarrollar una curva de dosis-respuesta para los niveles séricos de TMs de rata y su eficacia antitrombótica. La TMs recombinante de rata se administra a ratas en un modelo de cloruro férrico (FeCl₃) y se estudia el tiempo hasta la oclusión a varios puntos de tiempo. La dosis requerida para alcanzar un efecto antitrombótico máximo es 5 mg/kg administrados por vía subcutánea (s.c.). Esta respuesta es máxima a las 24 horas y persiste durante las 48 posteriores al tratamiento, pero no dura 72 horas. Las mediciones séricas simultáneas de TMs de rata usando ELISA revelan que la máxima concentración sérica conseguida tras 5 mg/kg por vía subcutánea es a las 24 horas de la administración. En un experimento aparte se establecen los datos farmacocinéticos intravenosos. Se ha encontrado que la semivida de la TMs, 1 mg/kg, administrada por vía

intravenosa (i.v.) es de aproximadamente 4 horas. En todos los experimentos, el vehículo para la TMs es solución salina y el volumen inyectado es 0,76 ml i.v. por rata y 1,64 ml s.c. por rata.

La evaluación de la función renal y el estado ácido-base se realiza del siguiente modo: En todos los casos, las muestras de sangre se obtienen de la vena de la cola y por punción aórtica en puntos de tiempo indicados tras PAC con halotano. Los niveles de creatinina sérica (SCr) se miden usando Creatinine Analyzer 2 (Beclanan-Coulter, Inc. Brea, CA) y se usa para evaluar la función renal. Los gases de sangre arterial (GSA) y los gases en sangre venosa (GSV) se obtienen de sus respectivos catéteres femorales antes de la operación a puntos de tiempo indicados y se analizan usando el analizador de gas en sangre ABL 77 (Radiometer Medicals, Copenhagen, Dinamarca).

en los estudios indícales se ha determinado que una pinza aórtica suprarrenal parcial (PAC) a una intensidad del 90% durante 60 minutos da una insuficiencia renal significativa pero reversible definida por un incremento de 3 a 8 veces en los niveles de creatinina en suero (SCr 0,75-2,5 mg/dl) a las 24 horas volverán a los niveles basales durante un periodo de 5 días. También se observa una tasa de mortalidad del 20% a esta intensidad y duración. Para evaluar el efecto del pretratamiento con TMs sobre la IRA isquémica usando el modelo de PAC descrito anteriormente, las ratas se dividen en dos grupos. Un grupo (tratado) recibe 5 mg/kg de TMs s.c. 24 horas antes de la cirugía, mientras que el otro grupo (sin tratar) recibe un volumen igual de solución salina 24 horas antes de la cirugía. Todas las ratas son sometidas a seguimiento y observación durante 4 días después de la lesión isquémica y la evaluación de la función renal usando creatinina en suero se realiza a diario.

Como se muestra en la Tabla 1, las ratas no tratadas sometidas a PAC I-R exhiben incrementos significativos en los niveles de creatinina sérica. En comparación con las ratas isquémicas no tratadas, la administración de una única dosis s.c. DE TMs (5 mg/kg) administrada 24 horas antes de la lesión isquémica PAC produce una reducción significativa de los niveles séricos de creatinina en tres escenarios diferentes de experimentos. Este efecto es significativo a 24 y 48 horas. Las ratas isquémicas no tratadas experimentaron una mortalidad del 25%, similar a la observada durante el experimento anterior con PAC. No obstante ninguna de las ratas tratadas con TMs murió. Durante todos los experimentos no se produjeron incidencias aparte de la hemorragia esperada durante la cirugía o la hemorragia durante cualquier procedimiento posterior.

Tabla 1- Efecto de la TMs sobre la función renal tras lesión isquémica

Tiempo (días)	TM s	Creatinina en suero
1	-	1,78 +/- 0,22
	+	0,52 +/- 0,27 p< 0,0001
2	-	1,43 +/- 0,32
	+	0,32 +/- 0,16 p< 0,005
3	-	0,3 +/- 0,14
	+	0,28 +/- 0,17
4	-	0,25 +/- 0,1
	+	0,18 +/- 0,05

La evaluación histológica y las pruebas de imagen funcionales en vivo de 2 fotones a 24 horas se evalúa en otro grupo de ratas que reciben pretratamiento con TMs 5 mg/kg s.c. 24 horas antes de 60 minutos de la lesión isquémica usando el modelo PAC y se compara con ratas isquémicas no tratadas sometidas a la misma lesión.

Las ratas no tratadas sometidas a PAC I-R demuestran una significativa congestión vascular medular observada en la morfología macroscópica de los riñones recogidos a las 24 horas. En el análisis histológico se observa un grado significativo de lesión renal con dilatación tubular extensa, congestión luminal con cilindros, degeneración de la estructura tubular, necrosis, pérdida del borde en cepillo y neutrofilia. La morfología macroscópica de las ratas tratadas con TMs observada a las 24 horas revela una disminución de la congestión vascular medular. En contraste con las ratas isquémicas no tratadas, las secciones renales obtenidas de las ratas tratadas con TMs (5 mg/kg) administrada 24 horas antes de la lesión, demuestran una reducción marcada de la gravedad de estas características histológicas. La lesión del túbulo proximal de la corteza es significativamente menor en el grupo tratado previamente con TMs en comparación con el grupo sin tratar. De forma similar, el daño tubular en la médula externa es significativamente menos grave en el grupo tratado previamente con TMs (Tabla 2).

Tabla 2. TMs reduce la necrosis renal

		Puntuación de la necrosis	
Tratamiento		Médula externa	Corteza
TMs		0,8 +/- 0,447214	0,6+/-0,547723
Control		3,2+/-0,447214	3,5+/-0,353553

Ejemplo 45 **Microvasculatura renal**

La trombomodulina soluble disminuye el incremento de la permeabilidad microvascular tras isquemia renal. Se usa microscopia intravital de 2 fotones para analizar los cambios en la permeabilidad de la microvasculatura renal para investigar el efecto de la TMs sobre la integridad de la microvasculatura. Se ha mostrado que el defecto es más extenso a las 24 horas tras la isquemia; por tanto, este punto de tiempo se escoge para la prueba de imagen. En las ratas control tratadas con solución salina, los autores observan pérdida de DBPM y de DAPM desde la microvasculatura renal. La extensión de pérdida de DAPM es menor que la de DBPM. Tras la isquemia en las ratas tratadas con TMs a las que se administran 5 mg/kg por vía subcutánea 24 horas antes de la isquemia, la extensión del DBPM es significativamente inferior al observado en los animales control tratados con solución salina. La pérdida de DAPM casi no se ve en ningún animal tratado previamente con TMs.

15 **Ejemplo 5****Isquemia renal**

La trombomodulina soluble disminuye la adhesión leucocitaria tras isquemia renal. Usando microscopia intravital de 2 fotones se estudia el efecto de la isquemia sobre la naturaleza dinámica de las adhesiones e interacciones leucocitarias que tienen lugar con el endotelio microvascular. En circunstancias fisiológicas, todos los leucocitos fluyen libremente en la microvasculatura renal. No obstante, 24 horas después de la lesión PAC I-R, existen pruebas del incremento de la adhesión leucocitaria al endotelio tanto en términos de leucocitos completamente adherentes como estáticos (12,9%) en la microvasculatura, así como adhesiones intermitentes (rodamiento) con el endotelio (18,2%). En consecuencia, el porcentaje de leucocitos que fluyen libremente disminuye en los animales isquémicos control (69,5%). En contraste con ello, los animales tratados con TMs demuestran un mayor porcentaje de leucocitos de flujo libre (88,3%) y un porcentaje significativamente menor de leucocitos en rodamiento (8,3%) o estáticos (3,3%). Todas estas diferencias entre las ratas no tratadas y tratadas con TMs son estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Las ratas tratadas con TMs exhiben velocidades de flujo sanguíneo más rápidas en comparación con las ratas no tratadas que tienen un flujo turbulento y lento. En las ratas no tratadas, se observan cilindros dentro de la luz tubular (BLEB de membrana, fragmentos celulares) que obstruyen el flujo, daño tubular y necrosis tubular con más frecuencia, mientras que en el grupo tratado con TMs hay mucho menos cilindros lumenales, mejor velocidad e flujo en la mayoría de las áreas y menos daño tubular.

Ejemplo 6**Función renal**

Para evaluar el efecto sobre la función renal de la TMs administrada tras lesión isquémica, la TMs se administra 2 horas después de la reperusión. La dosis de TMs administrada es de 1 mg/kg i.v. junto con una dosis simultánea de 5 mg/kg s.c. Las ratas isquémicas no tratadas reciben volúmenes similares de solución salina a través de vías similares. La justificación de la elección de esta dosis y la administración i.v. y s.c. simultánea se basa en la semivida de la TMs medida en experimentos distintos mencionados con anterioridad, para permitir suficientes niveles séricos durante al menos 24 horas después de la lesión. El tiempo terapéutico de 2 horas después de la lesión se escoge para imitar un escenario clínico humano con una ventana de tiempo realista terapéutico, cuando es práctico emplear un agente después de que se ha producido una agresión isquémica conocida. Las ratas se someten a seguimiento durante 48 horas y se realiza una evaluación de la función renal, el estado ácido-base, hematocritos, y enzimas musculares y hepáticas.

Las ratas no tratadas sometidas a PAC I-R exhiben incrementos significativos en los niveles de creatinina sérica. En

comparación con los controles, la administración simultánea de TMs 1 mg/kg i.v. y 5 mg/kg s.c. 2 horas después de la reperusión, atenúa de forma significativa la disfunción renal a las 24 horas producida por PAC I-R (Tabla 3).

- 5 Los niveles medios de creatinina en suero en el grupo tratado con TMs también son menores que en el grupo no tratado a las 48 horas, acercándose a una significación estadística ($P=0,08$). En el protocolo de tratamiento de 2 horas después de la lesión, las ratas isquémicas no tratadas experimentan una tasa de mortalidad del 45% a las 24 horas, mientras que ninguna de las ratas tratadas con TMs muere en el protocolo de 2 horas después del tratamiento.

Tabla 3- Efecto de TMs sobre la función renal tras lesión isquémica con tratamiento retardado

Tiempo (días)	TMs	Creatinina en suero
0	-	0,31 +/- 0,022
	+	0,32 +/- 0,075
1	-	2,3 +/- 0,99
	+	0,68 +/- 0,44 $p < 0,01$
2	-	1,94 +/- 1,56
	+	0,81 +/- 0,76

- 10 La ratas isquémicas no tratadas sometidas a PAC I-R tienen una elevación significativa de LDH, CK, AST y ALT, lo que sugiere una lesión isquémica-reperusión significativa en los músculos de las extremidades inferiores, los intestinos y el hígado. La administración de TMs a 1 mg/kg i.v. junto con la administración simultánea de 5 mg/kg atenúa esta elevación de las enzimas de forma significativa (Tabla 4). Dado que estos marcadores enzimáticos no son específicos de ningún órgano y se pueden liberar desde varios sitios sometidos a lesión de isquemia-reperusión, basta con decir que la TMs atenúa la lesión corporal global inducida por la pinza aórtica parcial isquemia-reperusión.
- 15

- En todas las ratas se miden otras bioquímicas en suero y el hematocrito. En ambos grupos se producen disminuciones similares del hematocrito a las 24 h y 48 h, como está previsto tras I-R IRA. Este hallazgo es importante, ya que avala el hecho de que no hay incremento de la incidencia de hemorragia en el grupo tratado con TMs.
- 20

Tabla 4- Efecto de los TMs sobre los marcadores de lesión tisular

	LDH*	CK	AST	ALT
Media del control	1068,4	209,6	557,8	97,6
SD del control	354,3195	23,13655	282,4973	53,67774
Media de TMs	393,8333	100	143,8333	38,66667
SD de TM	171,4916	51,93457	99,63416	9,770705
Valor P	0,002493	0,001867	0,008166	0,02583
* LDH (Lactato deshidrogenasa); CK (creatina quinasa); AST (aspartato transaminasa); ALT (alanina transaminasa).				

REIVINDICACIONES

- 1.- Trombomodulina soluble para usar en el tratamiento de un sujeto humano que tiene insuficiencia renal aguda, en el que dicha trombomodulina soluble es una variante secretada y soluble de la trombomodulina que carece de los dominios transmembrana y citoplasmático de la trombomodulina de longitud completa y, opcionalmente, también carece del dominio ST.
- 2.- Trombomodulina soluble para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insuficiencia renal aguda es el resultado de una lesión inflamatoria o isquémica.
- 3.- Trombomodulina soluble para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insuficiencia renal aguda se debe a necrosis tubular aguda resultante de isquemia renal.
- 4.- Trombomodulina soluble para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insuficiencia renal aguda se debe a nefritis intersticial aguda.