

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 767**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/JP2013/063743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13179910**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13796572 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2857037**

54 Título: **Agente para prevenir y/o tratar dolor neuropático periférico causado por un fármaco anticancerígeno**

30 Prioridad:

31.05.2012 JP 2012125316

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.02.2020

73 Titular/es:

KINKI UNIVERSITY (50.0%)

4-1, Kowakae 3-chome

Higashiosaka-shi, Osaka 577-8502, JP y

ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

KAWABATA ATSUFUMI y

SUZUKI HIDEAKI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 767 T3

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

Agente para prevenir y/o tratar dolor neuropático periférico causado por un fármaco anticancerígeno

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un medicamento que tiene un efecto profiláctico y/o terapéutico sobre un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno.

Antecedentes de la técnica

10 En el tratamiento terapéutico de cánceres (tumores malignos), cirugía, radioterapia y quimioterapia se usan apropiadamente independientemente o en combinación. Los agentes anticancerígenos (agentes anti-tumores malignos) usados para la quimioterapia contra el cáncer, entre las terapias mencionadas anteriormente, originalmente tienen citotoxicidad, y causan reacciones secundarias dañando no solo células cancerígenas (tumor maligno), sino también células normales.

15 Los ejemplos de reacciones secundarias causadas por agentes anticancerígenos incluyen trastornos sanguíneos, obstrucciones de órganos digestivos y neuropatía, pero el problema de la neuropatía aguda o crónica se está tornando más grave especialmente en los últimos años. Se considera que esto es porque las reacciones secundarias principales causadas por agentes anticancerígenos emergentes que tienen un efecto anticancerígeno notorio son en muchos casos neuropatías, el desarrollo de la neuropatía se mejora mediante la influencia de terapias multifármaco tales como la terapia FOLFOX, y tales reacciones secundarias como trastornos sanguíneos y obstrucciones de órganos digestivos tienden a mejorar. En las circunstancias actuales, con el fin de controlar tal neuropatía causada por agentes anticancerígenos, es obligatorio reducir las dosis de agentes anticancerígenos o interrumpir las quimioterapias contra el cáncer.

20 Las neuropatías causadas por agentes anticancerígenos también se observan en órganos sensibles tales como los órganos gustativos, así como en el sistema nervioso central, sistema nervioso vegetativo y sistema nervioso periférico. Entre ellas, las neuropatías periféricas, por ejemplo, dolores tales como dolor intenso y dolor urente, entumecimiento de la parte terminal de las extremidades, sensaciones anómalas tales como hipersensibilidad al frío, parestesias tales como anestesia y parálisis sensorial, ataxia sensorial, reducción de la fuerza muscular y similares se desarrollan muy frecuentemente, y la alodinia fría y alodinia mecánica, especialmente, causan problemas como síntomas típicos. Los ejemplos de agentes anticancerígenos que causan frecuentemente tales neuropatías periféricas incluyen fármacos taxanos (paclitaxel, docetaxel), fármacos alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina) y preparaciones de platino (oxaliplatino, cisplatino).

25 En la actualidad, no se ha instaurado ningún método eficaz para tratamientos profilácticos y terapéuticos contra neuropatías periféricas causadas por agentes anticancerígenos, especialmente alodinia. Aunque se ha descrito la utilidad de la administración intravenosa de calcio y magnesio o glutatión para neuropatías periféricas causadas por oxaliplatino, apenas se usa porque, por ejemplo, tal terapia complica adicionalmente la quimioterapia contra el cáncer, y tales sustancias requieren una administración masiva. En los campos clínicos prácticos, se requiere no convenientemente controlar las neuropatías periféricas causadas por agentes anticancerígenos con fisioterapia, terapias complementarias tales como masaje y acupuntura, o una combinación de farmacoterapias tales como las que usan esteroides, antidepresivos, antiepilépticos y opioides, sin embargo, la eficacia de estas terapias no se ha verificado, y tales terapias por sí mismas causan reacciones secundarias (Documentos no de patente 1 y 2).

30 La trombomodulina es conocida como una sustancia que actúa para unirse específicamente a la trombina para inhibir la actividad de coagulación sanguínea de la trombina y, al mismo tiempo, ejerce actividad anticoagulante para favorecer significativamente la capacidad de la trombina para activar la proteína C. La trombomodulina se descubrió y obtuvo primero como una glicoproteína expresada sobre las células endoteliales vasculares de diversas especies de animales que incluyen los humanos y, en lo que respecta a la estructura de la misma, está compuesta por 5 regiones, a saber, una región N-terminal (residuos de aminoácido 1 a 226), una región que tiene seis estructuras similares al FCE (residuos de aminoácido 227 a 462), una región de glicosilación unida mediante enlaces O- (residuos de aminoácido 463 a 497), una región transmembrana (residuos de aminoácido 498 a 521), y una región citoplásmica (residuos de aminoácido 522 a 557), a partir del lado N-terminal de la proteína (Documento no de patente 3).

35 La longitud completa de la trombomodulina apenas se disuelve en ausencia de un tensioactivo, y la adición de un tensioactivo es esencial para fabricar una preparación de trombomodulina completa. También está disponible una trombomodulina soluble que se puede disolver totalmente incluso en ausencia de un tensioactivo. La trombomodulina soluble se puede preparar retirando al menos una parte de la región transmembrana o la región transmembrana completa. Por ejemplo, se ha confirmado que una trombomodulina soluble que consiste en solo 3 regiones, a saber, la región N-terminal, la región que tiene seis estructuras similares al FCE y la región de glicosilación unida mediante enlaces O- (es decir, una trombomodulina soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido 19 a 516 de SEQ ID NO: 9), se puede obtener aplicando técnicas de recombinación, y que esa trombomodulina soluble recombinante resultante tiene la misma actividad que la de la trombomodulina natural (Documento de patente 1). También se ejemplifican trombomodulinas obtenidas a partir de orina humana y similares (Documento de patente 2).

Como se reconoce en muchos casos, como resultado de mutaciones espontáneas o mutaciones que se producen en el momento de la obtención, se han encontrado mutaciones polimórficas en los genes humanos. En la actualidad, se han identificado proteínas trombosmodulinas en las que el aminoácido en la posición 473 del precursor de la trombosmodulina humana que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en 575 residuos de aminoácido se convierte a Val o Ala. En la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, esta variación de residuos de aminoácido corresponde a la mutación a T o C en la posición 1418 (Documento no de patente 3). Sin embargo, los dos tipos de trombosmodulinas son completamente idénticos en el contexto de su actividad y sus propiedades fisicoquímicas, y se puede considerar que son sustancialmente idénticas.

En lo que respecta a los usos previstos de la trombosmodulina, la sustancia hasta ahora se ha destinado a usos en tratamientos terapéuticos y profilácticos de enfermedades, por ejemplo, infarto de miocardio, trombosis (por ejemplo, trombosis cerebral de una fase aguda o fase crónica, trombosis periférica aguda o crónica de arteria o vena y similares), embolia (por ejemplo, embolia cerebral de una fase aguda o fase crónica, embolia periférica aguda o crónica y similares), obstrucciones de vasos periféricos (por ejemplo, enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud y similares), arteriosclerosis obstructiva, obstrucciones funcionales desarrolladas después de una operación cardíaca, complicaciones de trasplantes de órganos, coagulación intravascular diseminada (CID), angina de pecho, ataque isquémico transitorio, toxemia del embarazo, trombosis venosa profunda (TVP) y similares. Además, los ejemplos de enfermedades aplicables, además de las acompañadas de hipercoagulación tales como trombosis y CID, incluyen afecciones del hígado (Documento de patente 4), enfermedades óseas absortivas (Documento de patente 5), cicatrización de heridas (Documento de patente 6) y similares. Asimismo, como usos de la trombosmodulina junto con otros principios activos, se han descrito la cicatrización de heridas (Documento de patente 7), protección de tejidos cerebrales (Documento de patente 8) y similares. Además, se ha descrito el uso de trombosmodulina para tratamientos terapéuticos y profilácticos del dolor con trasplante de células hematopoyéticas (Documento de patente 9).

Documentos de consulta de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: Patente japonesa sin examinar (KOKAI) con n.º de publicación 64-6219 Documento de patente 2: Patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 3-86900

Documento de patente 3: W092/00325

Documento de patente 4: Patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 8-3065

Documento de patente 5: Patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 8-301783

Documento de patente 6: Patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 9-20677

Documento de patente 7: Patente de EE. UU. n.º 5 976 523

Documento de patente 8: Patente de EE. UU. n.º 5 827 832

Documento de patente 9: Patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 2012-001543

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: NCI Cancer Bulletin, 23 de febrero de 2010, 7 (4)

Documento no de patente 2: Folia Pharmacologica Japónica (Nippon Yakurigaku Zasshi), 2010, 136:275-279

Documento no de patente 3: EMBO Journal, 1987, 6:1891-1897

Resumen de la invención

Objetivo que se desea conseguir con la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un medicamento que hace posible el tratamiento profiláctico y/o terapéutico eficaz de un dolor neuropático periférico causado por agente(s) anticancerígeno(s).

Medios para conseguir el objetivo

Los inventores de la presente invención reconocieron claramente las situaciones actuales como problemas que, para abordar la neuropatía causada por un agente anticancerígeno, era obligatorio reducir la dosis del agente cancerígeno o interrumpir la administración del agente anticancerígeno, y para los que no se había instaurado aún ningún tratamiento profiláctico y terapéutico eficaz de la neuropatía causada por un agente anticancerígeno, y consideraron que era un objetivo importante proporcionar un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico eficaz de la neuropatía causada por un agente anticancerígeno, especialmente dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno. Esto se debe a que los inventores de la presente invención consideraron que los dolores neuropáticos periféricos causados por un agente anticancerígeno dificultaban la vida cotidiana de los pacientes y esto

constituía la razón más significativa para la interrupción del tratamiento terapéutico del cáncer y, por lo tanto, resolver el problema de la alodinia causada por un agente anticancerígeno era importante para el tratamiento terapéutico del cáncer, no solo para mejorar la calidad de vida de los pacientes, sino también desde un punto de vista de la continuación del tratamiento terapéutico del cáncer.

5 Los inventores de la presente invención realizaron diversas investigaciones para conseguir el objetivo antes mencionado. Como resultado, sorprendentemente encontraron que la trombomodulina presentaba un efecto
10 profiláctico y/o terapéutico superior contra un dolor neuropático periférico, específicamente alodinia, causado por un agente anticancerígeno y lograron la presente invención. Hasta ahora no se ha descrito ni sugerido ningún tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la neuropatía causada por un agente anticancerígeno, especialmente dolor neuropático
15 periférico causado por un agente anticancerígeno, con trombomodulina. Aunque el Documento de patente 9 describe que la trombomodulina tiene un efecto sobre el dolor acompañado de aumento de peso debido a edema, depósito de ascitis o similares causado por pretratamientos de trasplante de células hematopoyéticas, el documento no menciona ni sugiere para nada el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno.

La presente invención, por lo tanto, proporciona lo siguiente.

15 [1] Un medicamento que comprende trombomodulina como principio activo para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia.

[2] El medicamento para uso según 1, en donde la trombomodulina es una trombomodulina soluble.

[3] El medicamento para uso según 1 o 2, en donde la trombomodulina es una trombomodulina humana.

20 [4] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 3, en donde el dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia es una o más clases de síntomas seleccionados entre entumecimiento de las extremidades, dolor de las extremidades, reducción del reflejo tendinoso profundo, reducción de la fuerza muscular, alodinia, hiperalgesia y disfunción motora.

[5] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 4, en donde el dolor neuropático periférico es alodinia.

[6] El medicamento para uso según 5, en donde la alodinia es alodinia mecánica.

25 [7] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en fármacos taxanos, preparaciones de platino y agentes alcaloides de la vinca.

[8] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en fármacos taxanos y preparaciones de platino.

30 [9] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en preparaciones de platino.

[10] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en fármacos taxanos.

35 [11] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa oxaliplatino como agente anticancerígeno.

[12] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa paclitaxel como agente anticancerígeno.

[13] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 6, en donde la quimioterapia usa agentes anticancerígenos según la terapia FOLFOX o terapia FOLFIRI.

40 [14] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 13, en donde el medicamento se administra intermitentemente.

[15] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 14, en donde el medicamento se administra a un
45 paciente con cáncer que padece una o más clases de cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma esofágico, leucemia, linfoma maligno, tumor pediátrico, mieloma múltiple, astrocitoma maligno, neuroglioma, enfermedad trofoblástica, tumor de células germinales, cáncer de pulmón, orquionco, cáncer vesical, tumor pélvico renal, uretrofima, cáncer de próstata, carcinoma del cérvix uterino, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, osteosarcoma, mesotelioma pleural maligno, osteonco maligno y cáncer de colon.

50 [16] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 15, en donde el medicamento se administra junto con un agente anticancerígeno.

[17] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 16, en donde la trombomodulina es un péptido obtenible a partir de una célula transformada preparada transfectando una célula huésped con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de (i-1) o (i-2) mencionadas a continuación, y el péptido es un péptido que tiene las actividades de trombomodulina;

5 (i-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 u 11, o

(i-2) la secuencia de aminoácidos de (i-1) mencionada anteriormente, que incluye además la sustitución, deleción o adición de uno o más residuos de aminoácido.

[18] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 16, en donde la trombomodulina es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de (i-1) o (i-2) mencionadas a continuación, y el péptido es un péptido que tiene las actividades de trombomodulina;

10

(i-1) la secuencia de aminoácidos de las posiciones 19 a 516 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 u 11, o

(i-2) la secuencia de aminoácidos de (i-1) mencionada anteriormente, que incluye además la sustitución, deleción o adición de uno o más residuos de aminoácido.

15

[19] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 18, en donde dicha trombomodulina se administra a un paciente intravenosamente.

[20] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 18, en donde dicha trombomodulina se administra a un paciente subcutáneamente.

20

[21] El medicamento para uso según 19, en donde dicha trombomodulina se administra a un paciente a una dosis de 0,01 a 1 mg/kg/día.

[22] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 21, en donde dicho medicamento es para uso en el tratamiento profiláctico.

[23] El medicamento para uso según uno cualquiera de 1 a 21, en donde dicho medicamento es para uso en el tratamiento terapéutico.

25

Efecto de la invención

La presente invención hace posible el tratamiento profiláctico y/o neuropático eficaz de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno. Con el fin de controlar el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno, hasta ahora ha sido inconvenientemente necesario reducir la dosis del agente anticancerígeno o interrumpir la quimioterapia contra el cáncer. La presente invención hace posible la continuación de quimioterapia contra el cáncer apropiada y la contribución a la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

30

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 presenta los resultados de la investigación del efecto profiláctico de la trombomodulina sobre la alodinia mecánica causada por la administración de paclitaxel, cuya investigación se realizó según el ensayo de von Frey.

35

Flecha hacia abajo blanca: Administración de 4 mg/kg de paclitaxel

Flecha hacia abajo negra: Administración de TMD123

o: Grupo de administración de disolvente

•: Grupo de administración de PTX

Δ: Grupo de administración de PTX + 0,1 mg/kg de TMD123

40

Δ gris: Grupo de administración de PTX + 1 mg/kg de TMD123

Δ negro: Grupo de administración de PTX + 10 mg/kg de TMD123

*: $p < 0,05$

** : $p < 0,01$ (comparación con el grupo de administración de disolvente)

†: $p < 0,05$

45

†††: $p < 0,001$ (comparación con el grupo de administración de PTX)

[Fig. 2] La Fig. 2 presenta los resultados de la investigación del efecto terapéutico de la trombomodulina sobre la alodinia mecánica causada por la administración de paclitaxel, cuya investigación se realizó según el ensayo de von Frey, al igual que la investigación cuyos resultados se presentan en la Fig. 1.

•: Grupo de administración de PTX

5 Δ: Grupo de administración de PTX + 10 mg/kg de TMD123

†: $p < 0,05$ (comparación con el grupo de administración de PTX)

rhTmα: TMD123

10 [Fig. 3] La Fig. 3 presenta los resultados de la investigación del efecto terapéutico de la trombomodulina sobre la alodinia mecánica causada por la administración de paclitaxel, cuya investigación se realizó según el ensayo de Randall-Selitto usando ratas, al igual que la investigación cuyos resultados se presentan en la Fig. 1.

Flecha hacia abajo blanca: Administración de 2 mg/kg de paclitaxel

Flecha hacia abajo negra: Administración de TMD123

o: Grupo de administración de disolvente

■: Grupo de administración de PTX

15 Δ: Grupo de administración de PTX + 10 mg/kg de TMD123

*: $p < 0,05$

** : $p < 0,01$ (comparación con el grupo de administración de disolvente)

†: $p < 0,05$

††: $p < 0,01$ (comparación con el grupo de administración de PTX)

20 **Modos de llevar a cabo la invención**

De aquí en adelante, se explicarán específicamente varias realizaciones preferidas de la presente invención (modos preferidos de llevar a cabo la invención, en lo sucesivo también denominados "realizaciones" en la especificación). Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a las realizaciones específicas explicadas a continuación.

25 Los ejemplos de trombomodulina útil como principio activo del medicamento para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno de esta realización incluyen la trombomodulina soluble.

30 La trombomodulina de esta realización se sabe que preferiblemente tiene una acción de (1) unirse selectivamente a la trombina (2) para favorecer la activación de la proteína C por la trombina. Además, es preferible que se confirme que la trombomodulina tiene generalmente (3) una acción de prolongar el tiempo de coagulación de la trombina, (4) una acción de suprimir la agregación plaquetaria causada por la trombina y/o (5) acción antiinflamatoria. Tales acciones poseídas por la trombomodulina se pueden denominar actividades de trombomodulina. Como actividades de trombomodulina, la trombomodulina preferiblemente tiene las acciones de (1) y (2) mencionadas anteriormente, y más preferiblemente tiene las acciones de (1) a (4) mencionadas anteriormente. Como actividades de trombomodulina, la trombomodulina más preferiblemente tiene todas las acciones de (1) a (5) mencionadas anteriormente.

35 La acción de la trombomodulina de unirse a la trombina se puede confirmar mediante los métodos de estudio descritos en diversas publicaciones conocidas tales como Thrombosis and Haemostasis, 1993, 70(3):418-422 y The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264, 9, páginas 4872-4876. En lo que respecta a la acción de favorecer la activación de la proteína C por la trombina, el grado de la actividad de favorecer la activación de la proteína C por la trombina o la presencia o ausencia de la acción se pueden confirmar fácilmente mediante los métodos de estudio descritos claramente en diversas publicaciones conocidas que incluyen, por ejemplo, la patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 64-6219. Además, la acción de prolongar el tiempo de coagulación de la trombina y/o la acción de suprimir la agregación plaquetaria causada por la trombina se pueden confirmar de forma similar y fácilmente. Asimismo, la acción antiinflamatoria también se puede confirmar mediante los métodos de estudio descritos en diversas publicaciones conocidas que incluyen, por ejemplo, Blood, 2008, 112:3361-3670 y The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115, 5:1267-1274.

45 La trombomodulina usada para esta realización no está particularmente limitada siempre que tenga las actividades de trombomodulina, pero la trombomodulina es preferiblemente una trombomodulina soluble en agua en la condición sin tensioactivos. La solubilidad de la trombomodulina soluble en agua tal como agua destilada usada para inyección (en ausencia de un tensioactivo tal como Triton X-100 o polidocanol y, generalmente, alrededor del intervalo de pH neutro) es preferiblemente, por ejemplo, 1 mg/mL o más o 10 mg/mL o más, preferiblemente 15 mg/mL o más o 17 mg/mL o

más, más preferiblemente 20 mg/mL o más, 25 mg/mL o más, o 30 mg/mL o más; particularmente preferiblemente 60 mg/mL o más. En algunos casos, la solubilidad es, por ejemplo, 80 mg/mL o más, o 100 mg/mL o más. Para determinar si una trombomodulina soluble se disuelve correctamente en agua o no, se entiende que el aspecto claro de una solución y la ausencia de sustancias insolubles observables aparentemente sirven como criterios sencillos, después de que la trombomodulina soluble se disuelve en agua y la solución se observa mediante inspección visual, por ejemplo, tan solo bajo una luz blanca en una posición que corresponde a una iluminación de aproximadamente 1000 lúmenes por metro cuadrado. También es posible observar la presencia o ausencia de algún residuo después de la filtración.

El peso molecular de la trombomodulina no está limitado siempre que tenga las actividades de trombomodulina como se describió anteriormente. El peso molecular es preferiblemente 100 000 o menor, más preferiblemente 90 000 o menor, aún más preferiblemente 80 000 o menor, lo más preferiblemente 70 000 o menor, y el peso molecular es preferiblemente 50 000 o mayor, lo más preferiblemente 60 000 o mayor. El peso molecular de la trombomodulina soluble se puede medir fácilmente mediante métodos comunes para medir el peso molecular de proteínas. La medición mediante espectrometría de masas es preferida, y el método de EM MALDI-TOF es más preferido. Para obtener una trombomodulina soluble que tiene un peso molecular dentro de un intervalo deseado, una trombomodulina soluble, que se obtienen cultivando una célula transformante preparada transfectando una célula huésped con un ADN que codifica la trombomodulina soluble usando un vector, se puede someter a fraccionamiento usando cromatografía en columna o similares como se describe más adelante.

La trombomodulina usada para la presente realización comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 19 a 132 de SEQ ID NO: 1, que se ha conocido como la porción central de las actividades de trombomodulina de la trombomodulina humana, y la trombomodulina no está particularmente limitada, siempre que la trombomodulina comprenda la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 19 a 132 de SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 19 a 132 de SEQ ID NO: 1 se puede mutar natural o artificialmente, siempre que la secuencia tenga una acción para favorecer la activación de la proteína C por la trombina, a saber, una de las actividades de trombomodulina. Específicamente, la secuencia puede comprender la sustitución, delección o adición de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácido en las posiciones 19 a 132 de SEQ ID NO: 1. El nivel aceptable de la mutación no está particularmente limitado, siempre que la secuencia de aminoácidos tenga las actividades de trombomodulina. Un ejemplo incluye una homología de secuencias de aminoácidos de 50 % o más, y la homología es preferiblemente 70 % o más, más preferiblemente 80 % o más, aún más preferiblemente 90 % o más, particularmente preferiblemente 95 % o más, y lo más preferiblemente 98 % o más. Tal secuencia de aminoácidos mutada que incluye la sustitución, delección o adición de uno o más residuos de aminoácido se denomina secuencia de mutación homóloga. Como se describe más adelante, estas secuencias de aminoácidos mutadas se pueden producir fácilmente usando técnicas de manipulación genética comunes. La trombomodulina no está particularmente limitada siempre que tenga la secuencia antes mencionada y la acción de unirse selectivamente a la trombina para favorecer la activación de la proteína C por la trombina al menos como la trombomodulina completa, pero la trombomodulina preferiblemente también tiene la acción antiinflamatoria.

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 comprende la mutación de Val como el aminoácido en la posición 125 de la secuencia de SEQ ID NO: 1 a Ala. La trombomodulina usada para la presente invención también comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 132 de SEQ ID NO: 3.

Como se describió anteriormente, aunque la trombomodulina usada para la presente invención no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 132 de SEQ ID NO: 1 o 3, o una secuencia de mutación homóloga de la misma, y comprenda al menos una secuencia de péptido que tiene las actividades de trombomodulina, los ejemplos preferidos de la trombomodulina incluyen un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 132 o 17 a 132 en indistintamente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, y un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia antes mencionada y que tiene al menos las actividades de trombomodulina. Un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 132 en indistintamente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 es más preferido. En otra realización, un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia de la posición 19 a 132 o 17 a 132 en indistintamente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 y que tiene al menos las actividades de trombomodulina es más preferido.

Como otra realización de la trombomodulina usada en esta realización, la trombomodulina comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de las posiciones 19 a 480 de SEQ ID NO: 5, que no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina comprenda la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 480 de SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de las posiciones 19 a 480 de SEQ ID NO: 5 puede ser una secuencia de mutación homóloga de la misma, siempre que la secuencia tenga una acción para favorecer la activación de la proteína C por la trombina, es decir, una de las actividades de trombomodulina.

La secuencia de SEQ ID NO: 7 comprende la mutación de Val como el aminoácido en la posición 473 de la secuencia de SEQ ID NO: 5 a Ala. La trombomodulina usada en esta realización también comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 480 de SEQ ID NO: 7.

Como se describió anteriormente, aunque la trombomodulina usada en esta realización no está particularmente limitada, siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de la posición 19 a 480 en indistintamente SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7, o una secuencia de mutación homóloga de la misma, y comprenda al menos una secuencia de péptido que tiene las actividades de trombomodulina, los ejemplos preferidos de la trombomodulina incluyen un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 480 o 17 a 480 en indistintamente SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7, y un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia antes mencionada y que tiene al menos las actividades de trombomodulina. Un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 480 de SEQ ID NO: 5 o 7 es más preferido. En otra realización, un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia de la posición 19 a 480 o 17 a 480 en indistintamente SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 y que tiene al menos las actividades de trombomodulina es más preferido.

Como otra realización de la trombomodulina usada en esta realización, la trombomodulina comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de SEQ ID NO: 9, que no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina comprenda la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de SEQ ID NO: 9 puede ser una secuencia de mutación homóloga de la misma, siempre que la secuencia tenga una acción para favorecer la activación de la proteína C por la trombina, es decir, una de las actividades de trombomodulina.

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 comprende la mutación de Val como el aminoácido en la posición 473 de SEQ ID NO: 9 a Ala. La trombomodulina usada en esta realización también comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de SEQ ID NO: 11.

Como se describió anteriormente, aunque la trombomodulina usada en esta realización no está particularmente limitada, siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de la posición 19 a 515 en indistintamente SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11, o una secuencia de mutación homóloga de la misma, y comprenda una secuencia de péptido que tiene al menos las actividades de trombomodulina, los ejemplos más preferidos incluyen un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 17 a 516 o 17 a 515 en indistintamente SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11, y un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia antes mencionada y que tiene al menos las actividades de trombomodulina. Un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 17 a 516 o 17 a 515 de SEQ ID NO: 9 es particularmente preferido. Una mezcla de los mismos también es un ejemplo preferido. En otra realización, un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 17 a 516 o 17 a 515 de SEQ ID NO: 11 es particularmente preferido. Una mezcla de los mismos también es un ejemplo preferido. Además, un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la misma y que tiene al menos las actividades de trombomodulina también es un ejemplo preferido. Se prefiere que la trombomodulina soluble también tenga la acción antiinflamatoria.

Un péptido que tiene una secuencia de mutación homóloga es como se describió anteriormente, y significa un péptido que puede comprender la sustitución, delección o adición de al menos uno, a saber, uno o más, preferiblemente varios (por ejemplo, 1 a 20, preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 5, particularmente preferiblemente 1 a 3) residuos de aminoácido, en la secuencia de aminoácidos del péptido en cuestión. Aunque el nivel aceptable de mutación no está particularmente limitado siempre que el péptido tenga las actividades de trombomodulina, un ejemplo del nivel aceptable de homología incluye 50 % o más de homología de secuencias de aminoácidos, y la homología puede ser preferiblemente 70 % o más, más preferiblemente 80 % o más, aún más preferiblemente 90 % o más, particularmente preferiblemente 95 % o más, y lo más preferiblemente 98 % o más.

Los ejemplos preferidos de la trombomodulina usada en esta realización también incluyen el péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14 (462 residuos de aminoácido), el péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8 (272 residuos de aminoácido) y el péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 6 (236 residuos de aminoácido) descritos en la patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 64-6219.

La trombomodulina usada en esta realización no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 132 en indistintamente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. Como tal trombomodulina, un péptido que tiene al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 480 en indistintamente SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 es preferido, y un péptido que tiene al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 en indistintamente SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11 es más preferido. Un ejemplo más preferido del péptido que tiene al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 en indistintamente SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11 es un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 19 a 514, 17 a 516, 17 a 515 o 19 a 514 en indistintamente SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11. Asimismo, una mezcla de péptidos que consisten cada uno en la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 19 a 514, 17 a 516, 17 a 515 o 19 a 514 en indistintamente SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11 también es un ejemplo preferido.

En el caso de la mezcla antes mencionada, la relación de mezcla de un péptido que empieza a partir de la posición 17 y un péptido que empieza a partir de la posición 19 para cada una de SEQ ID NO: 9 y 11 es, por ejemplo, 30:70 a 50:50, preferiblemente 35:65 a 45:55. Además, la relación de mezcla de un péptido que termina en la posición 514, un péptido que termina en la posición 515 y un péptido que termina en la posición 516 para cada una de SEQ ID NO: 9 y 11 es, por ejemplo, 0:0:100 a 0:90:10, o 0:70:30 a 10:90:0, o 10:0:90 a 20:10:70, si se desea. La relación de mezcla de los péptidos se puede determinar mediante un método común.

La secuencia de las posiciones 19 a 132 en SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de las posiciones 367 a 480 en SEQ ID NO: 9, y la secuencia de las posiciones 19 a 480 en SEQ ID NO: 5 corresponde a la secuencia de las posiciones 19 a 480 en SEQ ID NO: 9. Además, la secuencia de las posiciones 19 a 132 en SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia de las posiciones 367 a 480 en SEQ ID NO: 11, y la secuencia de las posiciones 19 a 480 en SEQ ID NO: 7 corresponde a la secuencia de las posiciones 19 a 480 en SEQ ID NO: 11. Asimismo, todas las secuencias de las posiciones 1 a 18 en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 son secuencias idénticas.

Como se describe a continuación, estas trombomodulinas usadas en esta realización se pueden obtener a partir de células transformantes preparadas transfectando células huésped con un ADN que codifica el péptido (específicamente, las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y similares) usando un vector.

Es suficiente con que estos péptidos solo tengan las secuencias de aminoácidos antes mencionadas, y puede estar unida o no unida una cadena de azúcar, la cual no particularmente limitada. En las técnicas de manipulación genética, un tipo de una cadena de azúcar, una posición a la que se añade una cadena de azúcar y un nivel de adición de la misma difieren en función de un tipo de células huésped usado, y se puede usar cualquier técnica. En lo que respecta a la posición de unión de una cadena de azúcar y un tipo de la misma, se conocen los hechos descritos en la patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 11-341990, y las trombomodulinas usadas en esta realización se pueden añadir con la misma cadena de azúcar en la misma posición. Dos tipos de cadenas de azúcar unidas mediante enlaces N-, las de tipo biantenarico de fucosilo y tipo triantenarico de fucosilo, se pueden unir a la trombomodulina de esta realización, y la relación de las mismas es, por ejemplo, 100:0 a 60:40, preferiblemente 95:5 a 60:40, más preferiblemente 90:10 a 70:30. La relación de estas cadenas de azúcar se puede medir sobre un mapa de cadenas de azúcar bidimensional descrito en *Biochemical Experimental Methods*, Vol. 23, *Methods of Researches on Glycoprotein Sugar Chains*, Japan Scientific Societies Press (1990) y similares. Asimismo, cuando se examina una composición de azúcar de la trombomodulina de esta realización, se detectan sacáridos neutros, aminosacáridos y ácido siálico, cuyo contenido puede ser, cada uno independientemente, por ejemplo, 1 a 30 %, preferiblemente 2 a 20 %, más preferiblemente 5 a 10 %, en el contexto de relación en peso basada en el contenido de proteína. Los contenidos de azúcar se pueden medir mediante los métodos descritos en *Lecture of New Biochemical Experiments*, Vol. 3, *Sugar I, Glycoprotein* (Libro 1), Tokyo Kagaku Dojin (1990) (sacáridos neutros: método de fenol-ácido sulfúrico, aminosacáridos: método de Elson-Morgan, ácido siálico: método de ácido periódico-resorcinol). Aunque el método para obtener trombomodulina no se limita a obtenerla mediante manipulación genética como se describe más adelante, como secuencia señal que se puede usar para la expresión donde la trombomodulina se obtiene mediante manipulación genética, se puede usar una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 18 en SEQ ID NO: 9, y una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 16 en SEQ ID NO: 9, y también se pueden usar otras secuencias señal conocidas tales como la secuencia señal del activador de plasminógeno tisular humano (Publicación internacional W088/9811).

Cuando una secuencia de ADN que codifica trombomodulina se introduce en una célula huésped, los ejemplos de métodos preferidos incluyen un método para incorporar una secuencia de ADN que codifica trombomodulina en, preferiblemente, un vector, más preferiblemente un vector de expresión capaz de expresarse en células animales, y a continuación introducir el ADN con el vector. Un vector de expresión es una molécula de ADN que está constituida por una secuencia promotora, una secuencia para añadir un sitio de unión del ribosoma a ARNm, una secuencia de ADN que codifica una proteína que se va a expresar, una señal de corte y empalme, una secuencia de terminación para la terminación de la transcripción, una secuencia de origen de replicación y similares. Los ejemplos de vector de expresión en células animales preferidos incluyen pSV2-X descrito por Mulligan R.C. et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, 78, 2072-2076); pBP69T (69-6) descrito por Howley P.M. et al. (*Methods in Emzymology*, 1983, 101, 387-402, Academic Press) y similares. Además, hay otra realización preferida en la que el ADN se introduce en un vector de expresión expresable en un microorganismo.

Los ejemplos de célula huésped que se puede usar en la producción de tales péptidos como se mencionó anteriormente incluyen células animales. Los ejemplos de células animales incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células COS-1, células COS-7, células VERO (ATCC CCL-81), células BHK, células MDCK obtenidas de riñón canino, células AV-12-664 de hámster y similares. Además, los ejemplos de célula huésped obtenida de humano incluyen células HeLa, células WI38, células 293 humanas y células PER.C6. De estas células, las células CHO son muy comunes y preferidas, y entre las células CHO, las células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) son más preferidas.

En un procedimiento de manipulación genética o un procedimiento de producción de péptido, también se usan con frecuencia microorganismos tales como *Escherichia coli*. Se usa preferiblemente un sistema huésped-vector adecuado para cada procedimiento y también se puede seleccionar un sistema de vector apropiado para las células huésped antes mencionadas. Se ha clonado un gen de trombomodulina usado en una técnica de recombinación genética. Los ejemplos de producción de trombomodulina mediante tal técnica de recombinación genética se han descrito y, además, también se conocen métodos para purificar trombomodulina para obtener un producto purificado de la misma (patentes japonesas sin examinar con n.º de publicación 64-6219, 2-255699, 5-213998, 5-310787, 7-155176 y *J. Biol. Chem.*, 1989, 264:10351-10353). Por lo tanto, la trombomodulina usada en esta realización se puede producir usando los métodos descritos en los documentos antes mencionados, o mediante métodos similares. Por ejemplo, la patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 64-6219 describe la cepa de *Escherichia coli* K-12 DH5 (n.º de entrada en la ATCC 67283) que contiene un plásmido pSV2TMJ2 que contiene un ADN que codifica la trombomodulina de

longitud completa. Esta cepa redepositada en el antiguo Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana (actualmente la institución administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario del Organismo Internacional de Patentes) (*Escherichia coli* DH5/pSV2TMJ2) (FERM BP-5570) también se puede usar. La trombomodulina usada en esta realización se puede preparar mediante una técnica de manipulación genética conocida que usa un ADN que codifica la trombomodulina de longitud completa como material de partida.

La trombomodulina de esta realización se puede preparar mediante un método conocido convencionalmente o un método similar. Por ejemplo, se puede consultar el método antes mencionado de Yamamoto et al. (solicitud de patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 64-6219) o el método descrito en la solicitud de patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 5-213998. Específicamente, por ejemplo, un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se prepara a partir de un gen de trombomodulina obtenido de humano mediante una técnica de manipulación genética y se puede modificar adicionalmente según sea necesario. Para tal modificación, con el fin de obtener un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12), los codones que codifican el aminoácido en la posición 473 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (en particular, el nucleótido en la posición 1418 en SEQ ID NO: 10) se mutan mediante mutagénesis dirigida al sitio según el método descrito por Zoller M.J. et al. (Method in Enzymology, 1983, 100:468-500, Academic Press). Por ejemplo, usando un ADN sintético para mutación que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, el nucleótido T en la posición 1418 en SEQ ID NO: 10 se puede transformar en el nucleótido C para obtener un ADN mutado.

El ADN preparado como se describió anteriormente se incorpora en, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) para obtener células transformantes. Tales células se someten a selección apropiada, y la trombomodulina purificada mediante un método conocido se puede producir a partir de una solución de cultivo obtenida cultivando una célula seleccionada. Como se describió anteriormente, el ADN (SEQ ID NO: 10) que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se transfecta preferiblemente a la célula huésped antes mencionada. El método para producir trombomodulina de esta realización no se limita al método antes mencionado. Por ejemplo, también es posible extraer y purificar la trombomodulina a partir de orina, sangre, otros fluidos corporales y similares, o extraer y purificar la trombomodulina a partir de un tejido que produce trombomodulina o un cultivo del tejido antes mencionado y similares. Además, la trombomodulina se puede someter adicionalmente a un tratamiento de escisión que usa una proteasa, según sea necesario.

Para el cultivo de la célula transformante antes mencionada, se puede usar un medio usado para el cultivo de células común, y es preferible cultivar previamente la célula transformante en diversas clases de medios para elegir un medio óptimo. Por ejemplo, se puede usar un medio conocido tal como medio MEM, medio DMEM y medio 199 como medio base, y se puede usar un medio mejorado adicionalmente o un medio con suplementos añadidos para diversos medios. Los ejemplos del método de cultivo incluyen cultivo sérico, en el que el cultivo se realiza en un medio que contiene suero sanguíneo, y cultivo exento de suero, en el que el cultivo se realiza en un medio que no contiene suero sanguíneo. Aunque el método de cultivo no está particularmente limitado, el cultivo exento de suero es preferido.

Cuando se añade suero a un medio, en el caso del cultivo sérico, el suero bovino es preferido. Los ejemplos de suero bovino incluyen suero bovino fetal, suero bovino de neonato, suero bovino de ternero, suero bovino de adulto y similares, y se puede usar cualquiera de estos ejemplos siempre que el suero sea adecuado para el cultivo celular. Como medio exento de suero en el cultivo exento de suero se pueden usar medios disponibles en el mercado. Se comercializan medios exentos de suero adecuados para diversas células y, por ejemplo, para la célula CHO, CD-CHO, CHOS-SFMI y CHOIII-PFM los vende Invitrogen, y el medio IS CHO, IS CHO-CD y similares los vende Irvine Scientific. Estos medios se pueden usar sin ningún tratamiento, o se pueden mejorar o añadir suplementos y usar. Los ejemplos del medio exento de suero incluyen además el medio DMEM que contiene 5 mg/L de cada uno de insulina, transferrina y ácido selenioso. Como se describió anteriormente, el medio no está particularmente limitado siempre que el medio se pueda usar para producir la trombomodulina de esta realización. El método de cultivo no está particularmente limitado, y se puede usar cualquiera de cultivo discontinuo, cultivo discontinuo repetitivo, cultivo semicontinuo, cultivo por perfusión y similares.

Cuando la trombomodulina usada en esta realización se prepara mediante el método de cultivo celular antes mencionado, se puede observar diversidad en el aminoácido N-terminal debido a la modificación postraduccional de la proteína. Por ejemplo, el aminoácido de la posición 17, 18, 19 o 22 en SEQ ID NO: 9 puede servir como aminoácido N-terminal. Además, por ejemplo, el aminoácido N-terminal se puede modificar para que el ácido glutámico en la posición 22 se cambie a ácido piroglutámico. Se prefiere que el aminoácido de la posición 17 o 19 sirva como aminoácido N-terminal, y se prefiere más que el aminoácido de la posición 19 sirva como aminoácido N-terminal. Además, también hay otra realización en la que el aminoácido de la posición 17 sirve como aminoácido N-terminal, la cual es una realización preferida. En lo que respecta a la modificación, diversidad y similares mencionadas anteriormente, se pueden mencionar ejemplos similares para la secuencia de SEQ ID NO: 11.

Además, cuando la trombomodulina soluble se prepara usando un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10, se puede observar diversidad del aminoácido C-terminal, y se puede producir un péptido un residuo de aminoácido más corto. Específicamente, el aminoácido C-terminal se puede modificar para que el aminoácido de la posición 515 sirva como aminoácido C-terminal, y además la posición 515 está amidada. Además, se puede producir

un péptido dos residuos de aminoácido más corto. Específicamente, el aminoácido de la posición 514 puede servir como aminoácido C-terminal. Por lo tanto, se puede producir cualquiera de los péptidos que tienen una diversidad significativa del aminoácido N-terminal y aminoácido C-terminal, o una mezcla de los mismos. Se prefiere que el aminoácido de la posición 515 o el aminoácido de la posición 516 sirva como aminoácido C-terminal, y se prefiere más que el aminoácido de la posición 516 sirva como aminoácido C-terminal. Además, también hay otra realización en la que el aminoácido de la posición 514 sirve como aminoácido C-terminal, la cual es una realización preferida. Respecto a la modificación, diversidad y similares descritas anteriormente, lo mismo se debe aplicar a un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12.

La trombomodulina obtenida mediante el método descrito anteriormente puede ser una mezcla de péptidos que tienen diversidad en los aminoácidos N-terminal y C-terminal. Los ejemplos específicos incluyen una mezcla de péptidos que tienen las secuencias de las posiciones 19 a 516, posiciones 19 a 515, posiciones 19 a 514, posiciones 17 a 516, posiciones 17 a 515, y posiciones 17 a 514 en SEQ ID NO: 9.

A continuación, el aislamiento y la purificación de trombomodulina a partir de un sobrenadante de cultivo o cultivo obtenido como se describió anteriormente se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos [compilado por Takeichi Horio, *Tanpakushitsu/Koso no Kiso Jikken Ho* (Fundamental Experimental Methods for Proteins and Enzymes), 1981]. Por ejemplo, es preferible usar cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de adsorción, que utiliza una interacción entre la trombomodulina y un vehículo cromatográfico sobre el que se inmovilizan grupos funcionales que tienen una carga opuesta a la de la trombomodulina. Otro ejemplo preferido es la cromatografía de afinidad que utiliza la afinidad específica con la trombomodulina. Los ejemplos preferidos de adsorbente incluyen la trombina, que es un ligando de la trombomodulina y un anticuerpo antitrombomodulina. Como anticuerpo, se pueden usar anticuerpos antitrombomodulina que tienen propiedades apropiadas o reconocen epítopos apropiados. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, los descritos en la patente japonesa con n.º de publicación (Kokoku) 5-42920, las patentes japonesas sin examinar con n.º de publicación 64-45398 y 6-205692 y similares. Otros ejemplos incluyen la cromatografía de filtración por gel y la ultrafiltración, que utilizan el tamaño molecular de la trombomodulina. Otros ejemplos incluyen además la cromatografía hidrófoba, que utiliza la unión hidrófoba entre un vehículo cromatográfico sobre el que se inmovilizan grupos hidrófobos y una porción hidrófoba de la trombomodulina. Asimismo, se puede usar hidroxapatita como vehículo en la cromatografía de adsorción, cuyos ejemplos incluyen, por ejemplo, los descritos en la patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 9-110900. Estos medios se pueden usar en combinación, según sea necesario. Aunque el grado de purificación se puede seleccionar en función de una finalidad de uso y similares, es deseable purificar la trombomodulina hasta que se obtiene una única banda como resultado de la electroforesis, preferiblemente SDS-PAGE, o se obtiene un único pico como resultado de la CLAR de filtración por gel o CLAR en fase inversa del producto aislado y purificado. Por supuesto, se debe entender que, cuando se usan dos o más tipos de trombomodulinas, se prefiere que solo se obtengan sustancialmente las bandas de las trombomodulinas, y no se requiere obtener una única banda.

Los ejemplos específicos del método de purificación usado en esta realización incluyen un método de purificación que usa las actividades de trombomodulina como criterio, por ejemplo, un método de purificación que comprende purificar ligeramente un sobrenadante de cultivo o un producto de cultivo con una columna de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow para recoger una fracción que tiene las actividades de trombomodulina; a continuación, purificar la fracción con una columna de afinidad, columna de DIP-trombina-agarosa (diisopropilfosforil-trombina-agarosa), como etapa de purificación principal para recuperar una fracción que tiene potentes actividades de trombomodulina; a continuación, concentrar la fracción recuperada seguido de filtración por gel para obtener una fracción activa de trombomodulina como un producto purificado (Gomi K. et al., *Blood*, 1990, 75: 1396-1399). Un ejemplo de las actividades de trombomodulina usadas como criterio es una actividad de favorecer la activación de la proteína C por la trombina. Otros ejemplos preferidos del método de purificación se ilustrarán a continuación.

Se selecciona una resina de intercambio iónico apropiada que tiene un buen estado adsorbente para la trombomodulina y se realiza la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. Un ejemplo particularmente preferido es un método que comprende el uso de Q Sepharose Fast Flow equilibrada con 0,02 mol/L de un tampón Tris-HCl (pH 7,4) que contiene 0,18 mol/L de NaCl. Después de lavar según sea necesario, la elución se puede realizar con 0,02 mol/L de un tampón Tris-HCl (pH 7,4) que contiene 0,3 mol/L de NaCl, por ejemplo, para obtener la trombomodulina como un producto ligeramente purificado.

A continuación, por ejemplo, una sustancia que tiene afinidad específica por la trombomodulina se puede inmovilizar sobre una resina para realizar la purificación por cromatografía de afinidad. Los ejemplos preferidos incluyen una columna de DIP-trombina-agarosa y una columna de anticuerpo monoclonal antitrombomodulina. En el caso de la columna de DIP-trombina-agarosa, la columna se equilibra previamente con 20 mmol/L de un tampón Tris-HCl (pH 7,4) que contiene 100 mmol/L de NaCl y 0,5 mmol/L de cloruro de calcio, y el producto ligeramente purificado antes mencionado se puede cargar a continuación en la columna, lavar según sea necesario y a continuación eluir con, por ejemplo, 20 mmol/L de un tampón Tris-HCl (pH 7,4) que contiene 1,0 mol/L de NaCl y 0,5 mmol/L de cloruro de calcio para obtener trombomodulina como un producto purificado. En el caso de la columna de anticuerpo monoclonal antitrombomodulina, un ejemplo del método comprende: poner en contacto una solución de anticuerpo monoclonal antitrombomodulina en 0,1 mol/L de un tampón NaHCO₃ (pH 8,3) que contiene 0,5 mol/L de NaCl con Sepharose 4FF (GE Health Care Biosciences) activada previamente con CNBr para obtener la resina Sepharose 4FF acoplada con los anticuerpos monoclonales antitrombomodulina, equilibrar la resina llenada en una columna de antemano con, por

ejemplo, 20 mmol/L de un tampón fosfato (pH 7,3) que contiene 0,3 mol/L de NaCl, lavar la resina según sea necesario, y a continuación realizar la elución con 100 mmol/L de un tampón glicina-HCl (pH 3,0) que contiene 0,3 mol/L de NaCl. Un efluente se puede neutralizar con un tampón apropiado para obtener un producto como un producto purificado.

5 Posteriormente, el producto purificado se ajusta a pH 3,5 y a continuación se carga sobre un intercambiador catiónico, preferiblemente SP-Sepharose FF (GE Health Care Biosciences) como intercambiador catiónico fuerte, se equilibra con 100 mmol/L de un tampón glicina-HCl (pH 3,5) que contiene 0,3 mol/L de NaCl, y se realiza el lavado con el mismo tampón para obtener una fracción no adsorbente. La fracción resultante se neutraliza con un tampón apropiado para obtener un producto altamente purificado. Estos productos se concentran preferiblemente mediante ultrafiltración.

10 Además, también es preferible intercambiar el tampón mediante filtración por gel. Por ejemplo, un producto altamente purificado concentrado mediante ultrafiltración se puede cargar en una columna Sephacryl S-300 o columna S-200 equilibrada con 20 mmol/L de un tampón fosfato (pH 7,3) que contiene 50 mmol/L de NaCl, y a continuación desarrollar por fraccionamiento con 20 mmol/L de un tampón fosfato (pH 7,3) que contiene 50 mmol/L de NaCl. La actividad de favorecer la activación de la proteína C por la trombina se puede confirmar para recoger una fracción activa y de ese modo obtener un producto altamente purificado con el tampón intercambiado. Con el fin de mejorar la seguridad, un
15 producto altamente purificado obtenido como se describió anteriormente se filtra preferiblemente a través de un filtro apropiado para eliminar virus tales como Planova 15N (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), y a continuación se puede concentrar mediante ultrafiltración a una concentración deseada. Por último, el producto se filtra preferiblemente a través de un filtro de filtración aséptica.

20 La "quimioterapia contra el cáncer" citada en esta realización significa un método para tratar un cáncer que usa un agente anticancerígeno. El "agente anticancerígeno" citado en esta realización no está particularmente limitando mientras sea un medicamento que tiene actividad anticancerígena, que causa síntomas de dolor neuropático periférico como reacciones secundarias cuando se administra a un paciente. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, agentes anticancerígenos que inhiben el metabolismo de los ácidos nucleicos (preparación de platino y similares), agentes anticancerígenos que inhiben la polimerización de microtúbulos (agentes alcaloides de la vinca), agentes anticancerígenos que inhiben la despolimerización de microtúbulos (agentes taxanos), agentes anticancerígenos que
25 presentan acción antagonista a las hormonas (agentes anti estrógenos y similares), agentes anticancerígenos que inhiben la transducción de la señal intracelular (inhibidores de proteosomas y similares), agentes anticancerígenos que actúan sobre una diana molecular específica de un tumor maligno (inhibidores de la tirosina quinasa, preparaciones de anticuerpo y similares), y agentes anticancerígenos que presentan una acción de activación de la inmunidad no específica (preparaciones de estreptococos hemolíticos y similares), y los agentes anticancerígenos que inhiben el metabolismo de los ácidos nucleicos y los agentes anticancerígenos que inhiben la polimerización o despolimerización de microtúbulos son preferidos. Por ejemplo, el agente anticancerígeno incluye una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en agentes taxanos y preparaciones de platino, y un agente taxano o una preparación de platino son preferidos, y un agente taxano es más preferido. En otra realización,
30 una preparación de platino puede ser preferida.

Los ejemplos de los agentes taxanos incluyen paclitaxel, docetaxel, tamoxifén y similares. Una o más clases seleccionadas del grupo que consiste en paclitaxel y docetaxel son preferidas, y el paclitaxel es más preferido.

Los ejemplos de preparaciones de platino incluyen oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, nedaplatino y similares. Una o más clases de preparaciones seleccionadas del grupo que consiste en oxaliplatino, cisplatino, carboplatino y nedaplatino son preferidas, y el oxaliplatino es más preferido.
40

El dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno, que es el objetivo del tratamiento profiláctico y/o terapéutico que usa el medicamento de esta realización, incluye al menos un dolor neuropático periférico causado por una terapia monofármaco que usa una única clase de agente anticancerígeno, y también abarca un dolor neuropático periférico causado por una terapia multifármaco que usa dos o más clases de medicamentos en combinación basados en modos de acción diferentes. Los ejemplos de la terapia multifármaco incluyen, por ejemplo, la terapia FOLFOX, terapia FOLFIRI y similares, pero la terapia no se limita a estos ejemplos. Como objetivo de la aplicación del medicamento de esta realización, por ejemplo, un dolor neuropático periférico causado por la terapia FOLFOX es preferido. En otra realización, un dolor neuropático causado por la terapia FOLFIRI puede ser preferido.
45

La terapia FOLFOX es una clase de quimioterapia contra el cáncer que usa oxaliplatino, fluorouracilo y levofolinato en combinación. La terapia FOLFOX se clasifica en, por ejemplo, FOLFOX2, FOLFOX3, FOLFOX4, FOLFOX6, mFOLFOX6, FOLFOX7, mFOLFOX7 y similares según el método de administración.
50

La terapia FOLFIRI es una clase de quimioterapia contra el cáncer que usa irinotecán, fluorouracilo, levofolinato y leucovorina en combinación.

Los ejemplos de los agentes anticancerígenos que inhiben el metabolismo de los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida y nimustina), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, mitomicina C y bleomicina), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, irinotecán y etopósido), preparaciones de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), inhibidores del metabolismo de la pirimidina (por ejemplo, mercaptopurina y fludarabina) e inhibidores de la síntesis de ácido fólico (por ejemplo,
55

metotrexato). Entre ellos, las preparaciones de platino son preferidas, y el oxaliplatino es más preferido, ya que es un agente anticancerígeno que causa más frecuentemente dolor neuropático periférico, y un método para tratar tal dolor neuropático periférico se desea fuertemente.

5 Los ejemplos de los agentes anticancerígenos que inhiben la polimerización o despolimerización de microtúbulos incluyen agentes alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina y vinblastina), agentes taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y tamoxifén) y agentes antiandrógenos (por ejemplo, flutamida). Entre ellos, los agentes taxanos son preferidos y el paclitaxel es más preferido.

Los ejemplos de agentes anticancerígenos que tienen acción antagonista a las hormonas incluyen, por ejemplo, agentes antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifén) y agentes antiandrógenos (por ejemplo, flutamida).

10 Los ejemplos de los agentes anticancerígenos que inhiben la transducción de la señal intracelular incluyen, por ejemplo, inhibidores de proteosomas (por ejemplo, bortezomib).

15 Los ejemplos de los agentes anticancerígenos que actúan sobre una diana molecular específica de un tumor maligno incluyen, por ejemplo, inhibidores de la tirosina quinasa BCR/ABL (por ejemplo, imatinib), inhibidores de la tirosina quinasa EGFR (por ejemplo, gefitinib), preparaciones de anticuerpos (por ejemplo, rituximab, trastuzumab y tocilizumab) y preparaciones de arsénico.

Los ejemplos de los agentes anticancerígenos que tienen una acción de activación de la inmunidad no específica incluyen, por ejemplo, preparaciones de estreptococos hemolíticos y preparaciones de polisacárido *Coriolus*.

20 El “dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno” citado en esta realización significa un dolor neuropático periférico causado como resultado de la administración de tal agente anticancerígeno como se ilustró anteriormente. También se puede denominar “dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia”. Los ejemplos de los síntomas de dolor neuropático periférico incluyen entumecimiento de las extremidades, dolor de las extremidades, reducción del reflejo tendinoso profundo, reducción de la fuerza muscular, alodinia, hiperalgesia y disfunción motora. Los ejemplos de los síntomas de dolor neuropático periférico también incluyen dolores tales como dolor intenso y dolor urente, entumecimiento de la parte terminal de las extremidades, sensación anómala tal como sensación de ardor, hiperestesia tal como hipersensibilidad al frío, parestesia tal como anestesia, parálisis sensorial, y malestar, ataxia sensorial y reducción de la fuerza muscular. Alodinia por lo general significa un síntoma de sentir un estímulo que por lo general no causa dolor (por ejemplo, contacto con la luz y presión, o estímulo de temperatura algo baja) como un dolor. La alodinia causada por un agente anticancerígeno incluye alodinia aguda, que se presenta inmediatamente después de la administración de un agente anticancerígeno, y alodinia crónica, que se presenta de una manera retardada durante la continuación del tratamiento con un agente anticancerígeno, y estos tipos de alodinia también están abarcados dentro del alcance del dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno citado en esta realización. La alodinia aguda es característica del oxaliplatino. Como criterios diagnósticos de la alodinia causada por un agente anticancerígeno, se usan DEB-NTC (Criterios de neurotoxicidad de Debiopharm), CTCAE (Criterios comunes de terminología para eventos adversos) y similares.

35 En esta realización, la alodinia como dolor neuropático periférico no está particularmente limitada siempre que sea un síntoma de sentir un estímulo que por lo general no causa dolor como un dolor. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, alodinia mecánica y alodinia fría, y la alodinia mecánica es un ejemplo preferido. En otra realización, la alodinia fría puede ser preferida.

40 Los ejemplos de la alodinia mecánica incluyen un síntoma de sentir un estímulo táctil que por lo general no causa dolor como un dolor. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, síntomas de dificultad en acciones cotidianas tales como abrochar botones de camisas, sacar monedas de un monedero y caminar.

Los ejemplos de la alodinia fría incluyen un síntoma de sentir un estímulo frío que por lo general no causa dolor como un dolor. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, síntomas de dificultad en acciones cotidianas tales como tareas de cocina y lavar usando agua, sujetar un vaso que contiene agua y salir en temporada de invierno.

45 En esta realización, la trombomodulina se puede administrar antes de que se administre un agente anticancerígeno (administración profiláctica) o se puede administrar después de que se administre un agente anticancerígeno (administración terapéutica). Es preferible administrarla después de que se administre un agente anticancerígeno. En otra realización, puede ser preferible administrarla antes de que se administre un agente anticancerígeno. Asimismo, la trombomodulina y un agente anticancerígeno también se pueden administrar simultáneamente. Como se presenta en el Ejemplo de ensayo 1 mencionado más adelante, administrar trombomodulina inmediatamente antes de administrar un agente anticancerígeno o administrar trombomodulina simultáneamente a administrar un agente anticancerígeno es una de las realizaciones preferidas de la administración profiláctica. Además, tanto en la administración profiláctica como en la administración terapéutica, la trombomodulina se puede administrar durante el periodo de administración de un agente anticancerígeno. Desde un punto de vista de continuidad del efecto, la administración profiláctica es preferida. En otras palabras, el medicamento de esta realización es preferiblemente un medicamento para tratamiento profiláctico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno.

55 Cuando la trombomodulina se administra antes de que se administre un agente anticancerígeno, el tiempo desde la

administración de trombomodulina hasta la administración del agente anticancerígeno no está particularmente limitado, siempre que el efecto de prevenir el dolor neuropático periférico pueda manifestarse. La trombomodulina se administra preferiblemente 9 días, más preferiblemente 7 días, aún más preferiblemente 5 días, todavía más preferiblemente 3 días, lo más preferiblemente 1 día antes de la administración del agente anticancerígeno o después de la misma. En otra realización, es más preferido que la trombomodulina se administre 12 horas antes de la administración de un agente anticancerígeno o después de la misma. Por ejemplo, la trombomodulina y un esteroide para profilaxis de un choque anafiláctico se pueden administrar simultáneamente, o se pueden administrar individualmente, antes de la administración de un agente anticancerígeno. Además, se puede administrar trombomodulina simultáneamente a, antes o después de la administración de un agente antiemético, agente antialérgico y/o agente antiinflamatorio, que generalmente se administra inmediatamente antes de la administración intravenosa de un agente anticancerígeno mediante infusión por goteo.

Cuando la trombomodulina se administra después de que se administre un agente anticancerígeno, el tiempo desde la administración del agente anticancerígeno hasta la administración de la trombomodulina no está particularmente limitado, siempre que el efecto del tratamiento terapéutico del dolor neuropático periférico pueda manifestarse. La trombomodulina se administra preferiblemente 8 días, más preferiblemente 6 días, aún más preferiblemente 4 días, particularmente preferiblemente 2 días, lo más preferiblemente 6 horas después de la administración del agente anticancerígeno o antes de la misma. En otra realización, es más preferido que la trombomodulina se administre 1 hora después de la administración de un agente anticancerígeno o antes de la misma.

El medicamento de esta realización puede contener un vehículo. Como vehículo útil en la presente invención, un vehículo soluble en agua es preferido y, por ejemplo, el medicamento de la presente invención se puede preparar añadiendo sucrosa, glicerina, modificador de pH que consiste en una sal inorgánica o similares como aditivos. Además, si es necesario, se pueden añadir aminoácidos, sales, carbohidratos, tensioactivos, albúmina, gelatina o similares como se describe en las patentes japonesas sin examinar con n.º de publicación (Hei)1-6219 y (Hei)6-321805, y también es preferible añadir un agente de conservación. Los ejemplos preferidos de agente de conservación incluyen ésteres del ácido parabenzóico, y un ejemplo particularmente preferido es el parabenzóico de metilo. La cantidad de agente de conservación que se debe añadir es por lo general 0,01 a 1,0 % (en términos de % en peso, lo mismo se debe aplicar a las descripciones siguientes), preferiblemente 0,1 a 0,3 %. El método para añadir estos aditivos no está particularmente limitado. En el caso de preparar un producto liofilizado, los ejemplos del método incluyen, por ejemplo, un método para mezclar una solución que contiene un agente anticancerígeno y una solución que contiene trombomodulina, y a continuación añadir aditivos a la mezcla, y un método para mezclar aditivos con un agente anticancerígeno disuelto previamente en agua, agua para inyección o un tampón apropiado, añadir una solución que contiene trombomodulina a la mezcla, mezclar la mezcla resultante para preparar una solución, y liofilizar la solución, en maneras tales como las empleadas habitualmente. Cuando el medicamento de la presente invención es un medicamento que comprende una combinación de componentes del medicamento, cada componente se prepara preferiblemente añadiendo un vehículo según un método de preparación apropiado. El medicamento de esta invención se puede proporcionar en forma de una inyección o en forma de una preparación liofilizada que se debe disolver para su uso.

Los ejemplos del método de preparación del medicamento incluyen un método para llenar una solución que contiene 0,05 a 15 mg/L, preferiblemente 0,1 a 5 mg/L, de trombomodulina, y los aditivos antes mencionados en agua para inyección o un tampón apropiado en una ampolla o un vial en un volumen de, por ejemplo, 0,5 a 10 mL, congelar la solución y secar la solución a presión reducida. Tal solución, por sí misma, se puede preparar como una preparación de solución acuosa para inyección.

El medicamento de la presente invención se administra convenientemente mediante administración parenteral tal como administración intravenosa, administración intramuscular y administración subcutánea. El medicamento también se puede administrar mediante administración oral, administración intrarrectal, administración intranasal, administración sublingual o similares. Cuando el medicamento de la presente invención es un medicamento que comprende una combinación de múltiples principios activos, cada principio activo del medicamento se administra preferiblemente mediante un método de administración adecuado para el principio.

Los ejemplos de método para la administración intravenosa incluyen un método para administrar una dosis deseada del medicamento de una sola vez y la administración intravenosa mediante infusión por goteo. El método para administrar una dosis deseada del medicamento de una sola vez (administración de bolo intravenoso) es preferido desde el punto de vista de que el método solo requiere un tiempo corto para la administración. Cuando el medicamento se administra de una sola vez, un periodo requerido para la administración usando una jeringa inyectable puede, generalmente, variar. En general, el periodo de tiempo requerido para la administración es, por ejemplo, 5 minutos o más corto, preferiblemente 3 minutos o más corto, más preferiblemente 2 minutos o más corto, aún más preferiblemente 1 minuto o más corto, particularmente preferiblemente 30 segundos o más corto, aunque depende del volumen que se va a administrar. Aunque el tiempo de administración mínimo no está particularmente limitado, el periodo es preferiblemente 1 segundo o más largo, más preferiblemente 5 segundos o más largo, aún más preferiblemente 10 segundos o más largo. La dosis no está particularmente limitada siempre que la dosis esté dentro de la dosis preferida antes mencionada. La administración intravenosa mediante infusión por goteo también es preferida desde un punto de vista de que el nivel sanguíneo de trombomodulina se puede mantener constante fácilmente.

Una dosis diaria del medicamento de la presente invención puede variar en función de la edad, el peso corporal de los pacientes, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y similares. En general, la dosis máxima es preferiblemente 20 mg/kg o menos, más preferiblemente 10 mg/kg o menos, aún más preferiblemente 5 mg/kg o menos, particularmente preferiblemente 2 mg/kg o menos y lo más preferiblemente 1 mg/kg o menos, y la dosis mínima es preferiblemente 0,001 mg/kg o más, más preferiblemente 0,005 mg/kg o más, aún más preferiblemente 0,01 mg/kg o más, particularmente preferiblemente 0,02 mg/kg o más y lo más preferiblemente 0,05 mg/kg o más, en términos de cantidad de trombomodulina.

En el caso de la administración de bolo intravenoso, aunque la dosis no está particularmente limitada siempre que la dosis esté dentro de la dosis preferida antes mencionada, la dosis diaria máxima es preferiblemente 1 mg/kg o menos, más preferiblemente 0,5 mg/kg o menos, aún más preferiblemente 0,1 mg/kg o menos, particularmente preferiblemente 0,08 mg/kg o menos y lo más preferiblemente 0,06 mg/kg o menos, y la dosis mínima es preferiblemente 0,005 mg/kg o más, más preferiblemente 0,01 mg/kg o más, aún más preferiblemente 0,02 mg/kg o más y particularmente preferiblemente 0,04 mg/kg o más. Cuando el medicamento de la presente invención se administra a un paciente que tiene un peso corporal que supera 100 kg, se puede administrar preferiblemente a una dosis fija de 6 mg, ya que el volumen sanguíneo no es proporcional al peso corporal, y el volumen sanguíneo es relativamente reducido con respecto al peso corporal en tal paciente.

En el caso de la infusión intravenosa continua, aunque la dosis no está particularmente limitada siempre que la dosis esté dentro de la dosis preferida antes mencionada, la dosis diaria máxima es preferiblemente 1 mg/kg o menos, más preferiblemente 0,5 mg/kg o menos, aún más preferiblemente 0,1 mg/kg o menos, particularmente preferiblemente 0,08 mg/kg o menos y lo más preferiblemente 0,06 mg/kg o menos, y la dosis mínima es preferiblemente 0,005 mg/kg o más, más preferiblemente 0,01 mg/kg o más, aún más preferiblemente 0,02 mg/kg o más y particularmente preferiblemente 0,04 mg/kg o más.

El medicamento de esta realización no está particularmente limitado, siempre que el efecto para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno se pueda confirmar después de la administración de trombomodulina, y el efecto se confirma en el plazo de, por ejemplo, 24 horas, preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 6 horas, aún más preferiblemente 3 horas, particularmente preferiblemente 1 hora, lo más preferiblemente 30 minutos, después de la administración de trombomodulina. Como se describió anteriormente, el medicamento de esta realización en ocasiones se puede caracterizar por que el efecto para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno se puede confirmar en una fase temprana.

El medicamento de esta realización se puede prescribir como una preparación para administración intermitente, o una preparación para administración continua, y se prescribe preferiblemente como una preparación para administración intermitente.

La administración intermitente significa administrar o liberar un medicamento a, o en el interior de, el cuerpo una o más veces, preferiblemente dos o más veces, con un cierto intervalo, de una manera discontinua. Por ejemplo, la administración intermitente se puede realizar mediante administración una o dos veces al día, y la administración una vez al día es preferida. Además, la administración intermitente se puede realizar mediante administración diaria, o administración 1 a 3 días a la semana, o administración 1 a 5 días a la semana, y la administración 1 día a la semana es preferida. En otra realización, la administración 5 días a la semana puede ser preferida. En otra realización más, la administración diaria puede ser preferida.

Además, la administración intermitente se puede realizar mediante administración una vez al día, una vez a la semana, 3 veces a la semana, 5 veces a la semana, o una vez cada dos semanas, y la administración una vez a la semana es preferida. En otra realización, la administración 5 veces a la semana puede ser preferida. En otra realización más, la administración diaria puede ser preferida. Además, la administración una vez cada dos semanas puede ser preferida, si procede.

La administración continua significa un método de administración en el que un medicamento se libera continuamente en el interior del cuerpo durante un cierto periodo de tiempo, por ejemplo, al menos 5 minutos o más largo. Siempre que se realice mediante administración sistémica o administración local a un tejido periférico, la vía de administración no está limitada. Los ejemplos de administración o medios de administración incluyen la administración que usa instrumentos tales como una bomba de infusión o bomba de transfusión, administración manual, preparaciones de liberación sostenida que utilizan un polímero degradable en seres vivos como vehículo, y similares.

El paciente al que se va a administrar el medicamento de esta realización no está particularmente limitado, siempre que se administre al paciente un agente anticancerígeno, y los ejemplos específicos incluyen pacientes con cáncer. Los ejemplos de pacientes con cáncer incluyen pacientes que padecen una o más clases de cánceres seleccionados del grupo que consiste en, por ejemplo, cáncer ovárico, cáncer de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma esofágico, leucemia, linfoma maligno, tumor pediátrico, mieloma múltiple, astrocitoma maligno, neuroglioma, enfermedad trofoblástica, tumor de células germinales, cáncer de pulmón, orquionco, cáncer vesical, tumor pélvico renal, uretrofima, cáncer de próstata, carcinoma del cérvix uterino, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, osteosarcoma, mesotelioma

pleural maligno, osteonco maligno y cáncer de colon.

5 El medicamento de esta realización se puede administrar junto con una o más clases de otros medicamentos usados para tratar neuropatías periféricas causadas por agentes anticancerígenos, por ejemplo, una o dos o más clases de medicamentos seleccionados entre esteroides, antidepresivos, antiepilépticos, opioides y similares, o se puede preparar como una mezcla con tal una o dos o más clases de medicamentos como se mencionó anteriormente, y administrar. Además, la trombomodulina se puede administrar con realización de fisioterapia, terapias complementarias tales como masaje y acupuntura, y similares.

10 Además, la presente invención también proporciona un medicamento para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno, que se administra junto con un agente anticancerígeno, y contiene trombomodulina como principio activo. Los ejemplos de trombomodulina usada en esta realización incluyen los ejemplos preferidos de trombomodulina soluble antes mencionados. Además, los ejemplos del agente anticancerígeno usado en esta realización incluyen los ejemplos preferidos del agente anticancerígeno antes mencionados. Asimismo, los ejemplos del dolor neuropático periférico citado en esta realización incluyen los ejemplos preferidos de dolor neuropático periférico antes mencionados.

15 La presente invención proporciona además un medicamento para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno, que comprende trombomodulina y un agente anticancerígeno como principios activos.

20 Asimismo, el uso de trombomodulina para fabricar un medicamento para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno también se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplos

La presente invención se explicará pormenorizadamente con referencia a los ejemplos de ensayo y ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada por estos ejemplos en absoluto.

[Explicación del listado de secuencias]

25 SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen usado en la producción de TME456
 SEQ ID NO: 2: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1
 SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen usado en la producción de TME456M
 SEQ ID NO: 4: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3
 30 SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen usado en la producción de TMD12 SEQ ID NO: 6:
 Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5
 SEQ ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen usado en la producción de TMD12M
 SEQ ID NO: 8: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7
 SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen usado en la producción de TMD123
 SEQ ID NO: 10: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9
 35 SEQ ID NO: 11: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen usado en la producción de TMD123M
 SEQ ID NO: 12: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11
 SEQ ID NO: 13: ADN sintético para mutación usado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida.

40 La trombomodulina de la presente invención usada en los ejemplos de ensayo se preparó según el método antes mencionado de Yamamoto et al. (el método descrito en la patente japonesa sin examinar con n.º de publicación 64-6219). Los ejemplos de preparación de la misma se describen a continuación. La seguridad de las trombomodulinas obtenidas en estos ejemplos de preparación se confirmó mediante ensayos de administración intravenosa únicos y repetitivos usando ratas y monos, ensayo de reproducción de ratones, ensayo de irritación local, ensayo de seguridad farmacológica, ensayo de inactivación viral y similares.

[Ejemplo de preparación 1]

45 <Obtención de trombomodulina>

Un producto altamente purificado se obtuvo mediante el método antes mencionado. Específicamente, células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectaron con un ADN que codificaba la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9

(que consistía específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10). A partir del cultivo de las células transformantes anteriores, se obtuvo un producto altamente purificado recogiendo una fracción activa con 20 mmol/L de un tampón fosfato (pH 7,3) que contenía 50 mmol/L de NaCl según el método de purificación convencional antes mencionado. El producto se concentró adicionalmente mediante ultrafiltración para obtener una solución de trombomodulina que tenía una concentración de 11,2 mg/mL (en lo sucesivo también abreviada como TMD123 en la memoria descriptiva).

<Preparación de solución de aditivo>

Se pesó clorhidrato de arginina (480 g, Ajinomoto), se colocó en un recipiente de acero inoxidable de volumen 10 L, se añadió agua para inyección (5 L) y se disolvió. La solución se ajustó a pH 7,3 añadiendo 1 mol/L de una solución de hidróxido de sodio.

<Preparación y llenado de solución de fármaco>

El volumen total de la solución de aditivo obtenida anteriormente se colocó en un recipiente de acero inoxidable de 20 L, se añadió la solución de TMD123 obtenida anteriormente (2398 mL, que correspondían a 26,88 g de proteína trombomodulina soluble, añadidos en una cantidad en exceso de 12 %), y se agitó la mezcla. Se añadió adicionalmente a la mezcla agua para inyección para obtener un volumen total de 12 L y se uniformizó la mezcla agitando. Esta solución de fármaco se sometió a esterilización por filtración usando un filtro que tenía un diámetro de poro de 0,22 µm (MCGL10S, fabricado por Millipore). El filtrado se llenó en viales en un volumen de 1 mL cada uno, y los viales se cerraron parcialmente con tapones de caucho.

<Liofilización>

Se realizó una etapa de liofilización en las condiciones siguientes, en el orden de liofilización → llenar con nitrógeno → cerrar por completo con tapón de caucho → enroscar tapón para obtener una preparación que contenía TMD123 que contenía 2 mg de trombomodulina soluble y 40 mg de clorhidrato de arginina en un vial.

<Condiciones de liofilización>

Enfriamiento preliminar (de temperatura ambiente a 15 °C a lo largo de 15 minutos) → enfriamiento principal (de 15 °C a -45 °C a lo largo de 2 horas) → retención (-45 °C durante 2 horas) → inicio de la aspiración al vacío (-45 °C durante 18 horas) → aumento de temperatura (de -45 °C a 25 °C a lo largo de 20 horas) → retención (25 °C durante 15 horas) → aumento de temperatura (de 25 °C a 45 °C a lo largo de 1 hora) → retención (45 °C durante 5 horas) → temperatura ambiente (de 45 °C a 25 °C a lo largo de 2 horas) → recuperación de la presión y llenado de nitrógeno (hasta -100 mmHg) → cierre completo con tapón → enroscado de tapón

[Ejemplo de preparación 2]

Células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectan con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12), se obtiene una solución de trombomodulina purificada a partir de un cultivo de las células transformantes anteriores (en lo sucesivo también abreviada como TMD123M en la memoria descriptiva) mediante el método de purificación convencional antes mencionado, y se obtiene una preparación de TMD123M liofilizada de la misma manera que se describió anteriormente.

[Ejemplo de preparación 3]

Células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectan con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2), se obtiene trombomodulina purificada a partir de un cultivo de las células transformantes anteriores (en lo sucesivo también abreviada como TME456 en la memoria descriptiva) mediante el método de purificación convencional antes mencionado, y se obtiene una preparación de TME456 liofilizada de la misma manera que se describió anteriormente.

[Ejemplo de preparación 4]

Células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectan con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4), se obtiene trombomodulina purificada a partir de un cultivo de las células transformantes anteriores (en lo sucesivo también abreviada como TME456M en la memoria descriptiva) mediante el método de purificación convencional antes mencionado, y se obtiene una preparación de TME456M liofilizada de la misma manera que se describió anteriormente.

[Ejemplo de preparación 5]

Células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectan con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6), se obtiene trombomodulina purificada a partir de un cultivo de las células transformantes anteriores (en lo sucesivo también

abreviada como TMD 12 en la memoria descriptiva) mediante el método de purificación convencional antes mencionado, y se obtiene una preparación de TMD 12 liofilizada de la misma manera que se describió anteriormente.

[Ejemplo de preparación 6]

5 Células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectan con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8), se obtiene trombomodulina purificada a partir de un cultivo de las células transformantes anteriores (en lo sucesivo también abreviada como TMD12M en la memoria descriptiva) mediante el método de purificación convencional antes mencionado, y se obtiene una preparación de TMD12M liofilizada de la misma manera que se describió anteriormente.

[Ejemplo de ensayo 1] Acción sobre alodinia de ratón inducida por paclitaxel

10 Con el fin de confirmar el efecto de la trombomodulina sobre la alodinia causada por un agente anticancerígeno, se investigó la acción de la trombomodulina sobre la alodinia causada por un estímulo mecánico generado cuando se administra un agente anticancerígeno, paclitaxel, a un ratón. TMD123 como fármaco de ensayo se administró intraperitonealmente a ratones y se realizó el ensayo siguiente.

(1) Ratones modelo de alodinia inducida por la administración de preparación de paclitaxel

15 Como animales experimentales, se usaron ratones macho ddY de 4 a 5 semanas (20 a 30 g) y se administraron intraperitonealmente 4 mg/kg de paclitaxel (en lo sucesivo también abreviado como PTX) a los ratones. La administración se realizó 4 veces en total en días alternos (días 0, 2, 4 y 6). A los ratones del grupo de control, se les administraron similarmente 0,5 mL del disolvente de PTX, es decir, solución de mezcla 1:1 de Cremophor EL y etanol, diluido a 1,5 mL con solución salina fisiológica. Como paclitaxel, se usó Paclitaxel (100 mg, LKT Laboratories, Inc.).

20 (2) Administración de fármaco de ensayo

En el experimento para evaluar el efecto profiláctico, los animales experimentales consistieron en 5 grupos, es decir, un grupo de control, un grupo de administración de PTX, y grupos de administración de PTX y 0,1, 1 o 10 mg/kg de trombomodulina (grupos de administración de PTX + TM). En el experimento para evaluar el efecto terapéutico, los animales experimentales consistieron en dos grupos, es decir, un grupo de administración de PTX y un grupo de administración de PTX y 10 mg/kg de trombomodulina (grupo de administración de PTX + TM). En el experimento de tratamiento profiláctico, se administró intraperitonealmente TMD123, que es trombomodulina, a los ratones del grupo de administración de PTX + TM una vez al día durante 7 días a partir del día del inicio de la administración de PTX. Además, en el experimento de tratamiento terapéutico, se administró intraperitonealmente TMD123 una única vez 8 o 9 días después del inicio final de la administración de PTX. A los ratones del grupo de control y el grupo de administración de PTX se les administró similarmente el disolvente de TMD123.

30 (3) Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron usando el ensayo de Wilcoxon para la comparación de dos grupos y el ensayo H de Kruskal-Wallis y el ensayo de tipo MDS (mínima diferencia significativa) para la comparación de tres o más grupos, y se determinó una tasa de 5 % o menor para indicar la presencia de diferencia significativa. Los significados de los símbolos usados en las gráficas son como se indica a continuación.

*, ** y ***: Comparación de los valores medidos para el grupo de control y el grupo de administración de PTX, los símbolos representan $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

† y †††: Comparación de los valores medidos para el grupo de administración de PTX y el grupo de administración de PTX y fármaco de ensayo, los símbolos representan $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente.

40 (4) Ensayo de von Frey

Los valores umbral de dolor de los ratones antes mencionados se midieron mediante el método de arriba-abajo que usa filamentos de von Frey. A saber, se usaron filamentos de von Frey para fuerzas de 0,008, 0,02, 0,04, 0,07, 0,16, 0,4, 0,6 y 1,0 g para estimular continuamente las plantas de las patas traseras de los ratones durante 6 segundos, y se observaron reacciones de los ratones tales como levantar, agitar y lamer las patas estimuladas. La estimulación se inició con una fuerza más pequeña y, cuando no se observó ninguna reacción, la estimulación se volvió a administrar a una fuerza un rango superior. Cuando se observó una reacción, la estimulación se administró a una fuerza un rango inferior después de un intervalo de 30 segundos o más largo. La estimulación se repitió 5 veces a partir de la primera reacción después de iniciar la estimulación, y la resistencia del filamento al que 50 % de los ratones presentaron reacciones se determinó como valor umbral nociceptivo. El valor umbral base se midió antes de la administración de PTX, y a continuación el valor umbral base se midió en el día de administración de PTX y el día 8 o 9 después del inicio de la administración para seguimiento. En el experimento de tratamiento terapéutico, en el día 8 o después del mismo, se confirmó suficiente reducción del valor umbral de dolor, y a continuación se realizó el ensayo de medición.

Como resultados del ensayo antes mencionado, (método de arriba-abajo que usa filamentos de von Frey), los resultados de la administración profiláctica de TMD123 se presentan en la Fig. 1, y los resultados de la administración

terapéutica de TMD123 se presentan en la Fig. 2. El valor umbral de dolor (Umbral) se redujo significativamente en el grupo de administración de PTX en comparación con el grupo de control, mientras que tal reducción del valor umbral observado en el grupo de administración de PTX se suprimió significativamente en el grupo de administración profiláctica de PTX + TM. Además, en el grupo de administración terapéutica de PTX + TM, el valor umbral, que se redujo mediante la administración de PTX, aumentó significativamente a partir de 30 minutos después de la administración, y se mantuvo a lo largo de 3 horas o más después de la administración.

En base a los resultados antes mencionados, se dio a conocer que la trombomodulina tiene efecto profiláctico y/o terapéutico contra la alodinia mecánica inducida por PTX con una propiedad de acción rápida y sostenibilidad superiores.

[Ejemplo de ensayo 2] Ensayo de estimulación con frío 1 (ensayo de placa fría)

Observando la alodinia inducida mediante estimulación con frío según el método mostrado a continuación, se puede verificar el efecto de la presente invención sobre un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno.

(1) Ratas modelo de alodinia inducida por la administración de preparación de paclitaxel

Como animales experimentales, se usan ratas macho SD de 5 semanas (150 a 200 g), y se administran intraperitonealmente 4 mg/kg de PTX a las ratas. La administración se realiza 4 veces en total en días alternos (días 0, 2, 4 y 6). A las ratas del grupo de control, se les administran similarmente 0,5 mL del disolvente de PTX, es decir, solución de mezcla 1:1 de Cremophor EL y etanol, diluido a 1,5 mL con solución salina fisiológica.

(2) Administración de fármaco de ensayo

Los animales experimentales consisten en tres grupos, es decir, un grupo de control, un grupo de administración de PTX y un grupo de administración de PTX y trombomodulina (grupo de administración de PTX + TM). A las ratas del grupo de administración de PTX + TM, se les administra intraperitonealmente TMD123, que es trombomodulina, una vez al día durante 7 días (10 mg/kg) a partir del día del inicio de la administración de PTX como administración profiláctica, y se les administra intraperitonealmente una única vez (10 mg/kg) al día siguiente de la administración final de PTX como administración terapéutica. A las ratas del grupo de control y el grupo de administración de PTX, se les administró similarmente el disolvente de TMD123.

(3) Ensayo de placa fría

Midiendo los tiempos de latencia para acciones evasivas después de administrar estímulos 5 veces alternativamente a las plantas de las patas traseras derecha e izquierda de las ratas de los 5 grupos antes mencionados usando una punta de una parte de estimulación con frío de un dispositivo de análisis del valor umbral de sensación de frío, que se controla para que esté a 8 °C, para observar la alodinia inducida mediante estimulación con frío, se puede confirmar el efecto de la presente invención sobre el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno. El tiempo de corte es, por ejemplo, 15 segundos. El ensayo de medición se puede realizar en los tiempos 5 horas antes de la administración de PTX, 1 hora después de la administración de PTX, 2, 3, 5, 7, 9 y 11 días después de la administración de PTX, 15 días después de la administración de PTX y antes de la administración de fármaco de ensayo, 15 días después de la administración de PTX y 6 horas después de la administración de fármaco de ensayo, 17 y 19 días después de la administración de PTX y antes de la administración de fármaco de ensayo, 22 días después de la administración de PTX y después de 3 días de periodo de retirada del fármaco, 26 días después de la administración de PTX y después de 7 días de periodo de retirada del fármaco, y 29 días después de la administración de PTX y después de 10 días de periodo de retirada del fármaco. Las condiciones experimentales se pueden cambiar apropiadamente.

[Ejemplo de ensayo 3] Ensayo de estimulación con frío 2

Usando ratas administradas con PTX de la misma manera que la del Ejemplo de ensayo 2 y observando la alodinia inducida mediante estimulación con frío según el método descrito a continuación, también se puede confirmar el efecto de la presente invención sobre el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno.

Las ratas se colocan en una jaula que tiene un fondo de tela metálica y se aclimatan durante 1 hora, y a continuación se pulverizan 0,05 mL de acetona sobre las patas traseras a lo largo de 5 segundos usando MicroSprayer (PENN-Century) para proporcionar estimulación con frío utilizando la acción de enfriamiento generada en el momento de la vaporización de acetona. Las reacciones de evasión de las ratas se observan durante 40 segundos a partir del inicio de la pulverización, y se registran los tiempos hasta que reaccionan (tiempos de latencia). El ensayo se realiza 3 veces para cada una de las patas derecha e izquierda y se calcula el promedio. La medición se puede realizar en los tiempos 5 horas antes de la administración de PTX, 1 hora después de la administración de PTX, 2, 3, 5, 7, 9 y 11 días después de la administración de PTX, 15 días después de la administración de PTX y antes de la administración de fármaco de ensayo, 15 días después de la administración de PTX y 6 horas después de la administración de fármaco de ensayo, 17 y 19 días después de la administración de PTX y antes de la administración de fármaco de ensayo, 22 días después de la administración de PTX y después de 3 días de periodo de retirada del fármaco, 26 días después

de la administración de PTX y después de 7 días de periodo de retirada del fármaco, y 29 días después de la administración de PTX y después de 10 días de periodo de retirada del fármaco. Las condiciones experimentales se pueden cambiar apropiadamente.

[Ejemplo de ensayo 4] Acción sobre alodinia de rata inducida por oxaliplatino

5 De la misma manera que las de los Ejemplos de ensayo 1 a 3, se realizan el ensayo de von Frey y el ensayo de estimulación con frío con administración de oxaliplatino usando ratas. El efecto de la presente invención sobre el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno se puede confirmar mediante estos ejemplos de ensayo.

[Ejemplo de ensayo 5] Desnaturalización *in vitro* de células nerviosas

10 Mediante el método siguiente, se puede confirmar el efecto de la acción de alivio de neuropatía periférica de la presente invención. Con el fin de examinar la acción sobre la desnaturalización de células nerviosas inducida por un tratamiento con paclitaxel, se usan las células de feocromocitoma 12 (FC 12) de glándula suprarrenal de rata y células de ganglio de la raíz dorsal (GRD), que son líneas celulares modelo de diferenciación nerviosa y extensión de neuritas.

(1) Cultivo de células

15 Las células FC 12 se cultivan a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂ usando el medio RPMI1640 (MP Biomedicals) que contiene 5 % de suero fetal bovino, 10 % de suero de caballo y 100 unidades/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL). Las células GRD se extraen a partir de una rata SD macho y se cultivan como cultivo primario, y a continuación 5 nódulos de GRD de L4 y L5 se trataron con colagenasa tipo I (Funakoshi) y dispasa I (Sanko Junyaku), se inocularon sobre una placa de 24 pocillos y se cultivaron adicionalmente. El cultivo se realiza a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂ usando el medio de Eagle modificado por Dulbecco (medio DMEM, MP Biomedical) que contiene 10 % de suero fetal bovino y 100 unidades/mL de penicilina/estreptomicina.

(2) Tratamiento con fármaco y medición de la longitud de neurita

25 Las células FC12 se inoculan sobre una placa de 24 pocillos a una densidad de 10 000 células/pocillo, a continuación, después de 3 horas, las células se tratan con 0,01 mmol/L de Fos-Choline para permitir la extensión de las neuritas y, después de 24 horas, las células se tratan con una solución de ensayo. Las células GRD se cultivan durante una semana y, después de confirmar la adherencia celular y extensión de neuritas, se tratan con una solución de ensayo. Como solución de ensayo, solo se añade una solución de 10 ng/mL de paclitaxel, o se añade una solución de 10 ng/mL de paclitaxel y un fármaco de ensayo (10 ng/mL a 0,1 mg/mL). Después de 24 y 96 horas a partir del tratamiento con una solución de ensayo, el medio se intercambia por un medio fresco que contiene el fármaco de ensayo y, después de 168 horas, se tiñen solo las células muertas con una solución de tinción de azul tripano y las células se fotografían con un microscopio óptico (magnificación, 200 veces; 3 visualizaciones/pocillo). Después de la toma de fotografías, las longitudes de las neuritas de células vivas se miden con el programa de análisis Image J. Las condiciones experimentales se pueden cambiar apropiadamente.

[Ejemplo de ensayo 6] Acción sobre alodinia de rata inducida por paclitaxel

35 De la misma manera que la del Ejemplo de ensayo 1, la acción de la trombomodulina sobre alodinia inducida mediante estimulación mecánica generada cuando el agente anticancerígeno, paclitaxel, se administró a ratas se investigó mediante el método descrito a continuación. TMD123 como fármaco de ensayo se administró intraperitonealmente a ratas y se realizó el ensayo siguiente.

(1) Ratas modelo de alodinia inducida por la administración de preparación de paclitaxel

40 Como animales experimentales, se usaron ratas macho Wistar de 5 a 6 semanas (200 a 250 g) y se administraron intraperitonealmente 2 mg/kg de PTX a las ratas. La administración se realizó 4 veces en total en días alternos (días 0, 2, 4 y 6). A las ratas del grupo de control, se les administraron similarmente 0,5 mL del disolvente de PTX, es decir, solución de mezcla 1:1 de Cremophor EL y etanol, diluido a 1,5 mL con solución salina fisiológica.

(2) Administración de fármaco de ensayo

45 En el experimento para evaluar el efecto profiláctico que usa las ratas, los animales experimentales consistieron en tres grupos, es decir, un grupo de control, un grupo de administración de PTX y un grupo de administración de PTX y 10 mg/kg de trombomodulina (grupo de administración de PTX + TM). Como administración profiláctica, se administró intraperitonealmente TMD123, que es trombomodulina, a las ratas una vez al día durante 7 días (10 mg/kg) a partir del día del inicio de la administración de PTX.

50 (3) Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron usando el ensayo H de Kruskal-Wallis y el ensayo de tipo MDS (mínima diferencia significativa), y se determinó una tasa crítica de 5 % o menor para indicar la presencia de diferencia significativa. Los significados de los símbolos usados en las gráficas son como se indica a continuación.

* y **: Comparación de los valores medidos para el grupo de control y el grupo de administración de PTX, los símbolos representan $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente

† y ††: Comparación de los valores medidos para el grupo de administración de PTX y el grupo de administración de PTX y fármaco de ensayo, los símbolos representan $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente

5 (4) Ensayo de Randall-Selitto

Las ratas antes mencionadas se sometieron a una medición basada en el ensayo de presión sobre una pata descrito en Randall LO. et al., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 1957, 111, 409-419 (ensayo de Randall-Selitto). A saber, la pata trasera derecha se sometió a presión gradualmente creciente con un analizador de efecto analgésico de la estimulación por presión, y la presión a la que cada rata presentó una reacción de fonación o reacción de escape anómala se determinó como el valor umbral de dolor.

Los resultados del ensayo para administración profiláctica de TMD123 que usa ratas se presentan en la Fig. 3. Mientras que el valor umbral de dolor (Umbral) se redujo significativamente en el grupo de administración de PTX en comparación con el grupo de control, tal reducción del valor umbral observado en el grupo de administración de PTX se suprimió significativamente en el grupo de administración de PTX + TM. Además, en el ensayo usando ratas, la reducción del valor umbral observado en el grupo de administración de PTX se suprimió significativamente en el grupo de administración de PTX + TM a lo largo de 28 días.

En base a los resultados anteriores, se dio a conocer que la trombomodulina presenta efecto profiláctico contra la alodinia mecánica inducida por PTX con una propiedad de acción rápida y sostenibilidad superiores.

[Ejemplo de ensayo 7] Efecto profiláctico sobre el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno en humanos

Por ejemplo, cuando se realiza quimioterapia de 12 ciclos, cada uno de los cuales consiste en dos semanas, con FOLFOX6, mFOLFOX6 o similares para un paciente con un tumor maligno tal como cáncer de colon, se administra TMD123 (por ejemplo, Recomedulin (marca comercial registrada), Asahi Kasei Pharma Corporation) al paciente inmediatamente antes, durante o inmediatamente después de la administración del agente anticancerígeno en cada ciclo.

Después de la finalización de la quimioterapia, investigando la tasa de abandono de la quimioterapia, la tasa de incidencia de dolor neuropático periférico, la CDV, el cambio de los datos de laboratorio del estudio de coagulación, el efecto sobre el tumor y similares, se puede confirmar el efecto profiláctico de la presente invención sobre el dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno en humanos. El tipo de agente anticancerígeno, las dosis del agente anticancerígeno y TMD123, la regulación del tiempo de administración, la longitud del ciclo, el número del ciclo y similares se pueden cambiar apropiadamente según los conocimientos técnicos habituales.

Aplicabilidad industrial

El medicamento de la presente invención es extremadamente eficaz para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un dolor neuropático periférico causado por un agente anticancerígeno, y puede mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes, que está marcadamente degradada por un dolor neuropático periférico causado por un tratamiento con un agente anticancerígeno. Por lo tanto, el medicamento de la presente invención es útil en el campo de la industria farmacéutica.

Listado de secuencias

<110> Asahi Kasei Pharma Corporation

<120> Agente para prevenir y/o tratar dolor neuropático periférico causado por un fármaco anticancerígeno

<130> F113070-WO

<150> JP 2012-125316

<151> 2012-05-31

<160> 13

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> humano

<400> 1

ES 2 743 767 T3

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 \201@\201@\201@5\201@\201@\201@\201@\201@\201@ \201@
 10\201@\201@\201@\201@\201@\201@\201@ 15
 Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro
 \201@\201@\201@\201@\201@ 20 \201@\201@\201@\201@\201@\201@\201@25
 \201@\201@\201@\201@\201@\201@\201@ 30
 Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro
 \201@\201@\201@ 35 \201@\201@\201@\201@\201@\201@\201@ 40
 \201@\201@\201@ \201@\201@\201@\201@\201@45
 Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala
 50 \201@\201@\201@\201@ \201@\201@\201@\201@55
 \201@\201@\201@\201@\201@\201@\201@ 60
 Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
 65\201@\201@\201@ \201@\201@\201@\201@\201@70
 \201@\201@\201@\201@\201@\201@\201@ 75 \201@\201@\201@
 \201@\201@\201@\201@\201@80
 Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu
 \201@\201@\201@ \201@\201@\201@ 85 \201@\201@\201@\201@\201@
 \201@\201@90 \201@\201@\201@\201@\201@\201@ \201@\201@ 95
 Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly
 \201@\201@\201@\201@\201@100 \201@\201@ \201@\201@\201@\201@ 105
 \201@\201@\201@\201@\201@ \201@ 110
 Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile
 \201@\201@ 115 \201@\201@ \201@\201@\201@120
 \201@\201@\201@\201@\201@\201@ 125
 Gly Thr Asp Cys
 \201@\201@130

<210> 2
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> humano

5

<400> 2
 atgcttgggg tcctgtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgaccgc 60
 tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
 gtctgcgccg agggcttcgc gccattccc cagagccgc acaggtgcca gatgttttgc 180
 aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcct 240
 gaagctaca tcctggacga cggtttcac tgcacggaca tcgacgagtgc gaaaacggc 300
 ggcttctgct ccggggtgt ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggcc 360
 gactcggccc ttgtccgcca cattggcacc gactgt 396

10

<210> 3
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> humano

15

<400> 3
 Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro
 \201@\201@\201@\201@\201@ 20 \201@\201@\201@\201@\201@ 25 30
 Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro
 35 40 45
 Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala
 50 55 60
 Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
 65 70 75 80
 Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu
 85 90 95
 Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly
 100 105 110
 Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile
 115 120 125
 Gly Thr Asp Cys
 130

20

<210> 4
 <211> 396

ES 2 743 767 T3

<212> ADN
<213> humano

<400> 4

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgacccg 60
 tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
 gtctgcgccc agggcttcgc gccattccc cagcagccgc acaggtgcca gatgttttgc 180
 aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcctt 240
 gaaggtaca tcctggacga cggtttcacg tgcacggaca tcgacgagtg cgaaaacggc 300
 ggcttctgct cgggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggcc 360
 5 gactcgcccc ttgcccgcca cattggcacc gactgt 396

<210> 5
<211> 480
<212> PRT
10 <213> humano

<400> 5

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
 20 25 30
 His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
 35 40 45
 Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
 50 55 60
 Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
 85 90 95
 Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
 100 105 110
 Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270

ES 2 743 767 T3

Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 300
 Ser Tyr Ser Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480

<210> 6
 <211> 1440
 <212> ADN
 <213> humano

5

<400> 6
 atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgcaacc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccg 120
 ggcccgcgca ccttctctcaa tgccagtcaag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaagt 180
 acagtgcgct cctcgggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gtttgccgcc gccgcctctg gatcggcctg cagctgccac cgggctgcgg cgaccccaag 300
 cgcctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgtctgc 420
 tccgctgctg aggccactgt gccagcgag cccgatctggg agggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttctctct cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagccggcgg ccgcggtctg cgccgtctcg atcacctacg gcaccccgtt cgcggcccgc 600
 ggagcggact tccaggcgct gccgggtggc agctccgcgg cgggtggctcc cctcggctta 660
 cagctaatgt gcaccgcgcc gcccgagcgg gtcagggggc actgggcccag ggaggcggcc 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
 ggggctcccc gctgccagt cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccacccc 900
 gaccagccgg gtcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccgggtgc aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtcggtgtcc gcagcgtgtg 1020
 gtcaacacac aggggtggct cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agccogtggc cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaaa ctagctacct ctgctctgct gccgagggct tcgcgcccac tcccacagag 1200
 ccgcacaggt gccagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
 accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgtcc gccacattgg caccgactgt 1440

10

<210> 7
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> humano

15

<400> 7
 Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu

ES 2 743 767 T3

```

                20                25                30
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
   35                40                45
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
   50                55                60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
   65                70                75                80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
   85                90                95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
  100                105                110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
  115                120                125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
  130                135                140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
  145                150                155                160
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
  165                170                175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
  180                185                190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
  195                200                205
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
  210                215                220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
  225                230                235                240
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
  245                250                255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
  260                265                270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
  275                280                285
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
  290                295                300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
  305                310                315                320
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
  325                330                335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
  340                345                350
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
  355                360                365
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
  370                375                380
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
  385                390                395                400
Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
  405                410                415
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
  420                425                430
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
  435                440                445
Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
  450                455                460
Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
  465                470                475                480

```

<210> 8

<211> 1440

5 <212> ADN

<213> humano

<400> 8

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccttgccg gcctggggtt cccgcaccc 60

10

ES 2 743 767 T3

gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcag actgcttcgc gctctaccg 120
 ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcaag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaag 180
 acagtgcgct cctcgggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gttggccgcc ggcgcctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
 cgctcggggc cctgcgcgcg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtggggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgtctgc 420
 tccgctgctg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagcccggcg ccgcggtgct gcgccgtctg atcacctacg gcaccccgtt cgcggcccg 600
 ggagcggact tccagggcgt gccggtgggc agctccgccc cggtggctcc cctcggctta 660
 cagctaatgt gcaccgcgcc gcccgagcgg gtccaggggc actggggccag ggaggcggcg 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgcgatccct 780
 ggggtcccc gctgccagtg cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccacccc 900
 gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgt 1020
 gtcaacacac aggtgggctt cgagtgcac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaa ctagctacct ctgctctgct gccgaggct tcgcgcccat tccccacgag 1200
 ccgcaagggt gccagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctcccgggt 1380
 acctcgagt gcactctgcg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440

<210> 9
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 9
 Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
 20 25 30
 His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
 35 40 45
 Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
 50 55 60
 Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
 85 90 95
 Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
 100 105 110
 Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys

10

ES 2 743 767 T3

	275		280		285											
Asn	Asp	Leu	Cys	Glu	His	Phe	Cys	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Gln	Pro	Gly	
	290					295					300					
Ser	Tyr	Ser	Cys	Met	Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Ala	Asp	Gln	
305					310					315					320	
His	Arg	Cys	Glu	Asp	Val	Asp	Asp	Cys	Ile	Leu	Glu	Pro	Ser	Pro	Cys	
				325					330					335		
Pro	Gln	Arg	Cys	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Gly	Phe	Glu	Cys	His	Cys	Tyr	
			340					345					350			
Pro	Asn	Tyr	Asp	Leu	Val	Asp	Gly	Glu	Cys	Val	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	
	355						360					365				
Cys	Phe	Arg	Ala	Asn	Cys	Glu	Tyr	Gln	Cys	Gln	Pro	Leu	Asn	Gln	Thr	
370					375						380					
Ser	Tyr	Leu	Cys	Val	Cys	Ala	Glu	Gly	Phe	Ala	Pro	Ile	Pro	His	Glu	
385					390					395					400	
Pro	His	Arg	Cys	Gln	Met	Phe	Cys	Asn	Gln	Thr	Ala	Cys	Pro	Ala	Asp	
				405					410					415		
Cys	Asp	Pro	Asn	Thr	Gln	Ala	Ser	Cys	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ile	
			420					425					430			
Leu	Asp	Asp	Gly	Phe	Ile	Cys	Thr	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Glu	Asn	Gly	
	435						440					445				
Gly	Phe	Cys	Ser	Gly	Val	Cys	His	Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Glu	Cys	
450					455						460					
Ile	Cys	Gly	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	His	Ile	Gly	Thr	Asp	Cys	
465					470					475					480	
Asp	Ser	Gly	Lys	Val	Asp	Gly	Gly	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	
				485					490					495		
Pro	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ala	Val	Gly	Leu	
			500					505					510			
Val	His	Ser	Gly													
			515													

<210> 10
 <211> 1548
 <212> ADN
 <213> humano

5

<400> 10
 atgcttgggg tcctggctcct tggcgcgctg gccctggcgg ccttgggggtt ccccgcaacc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcagc actgcttcgc gctctaccgc 120
 ggccccgcga ccttctctca tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaag 180
 acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgtc atttcttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gttggccgcc ggcgcctctg gatcggcctg cagctgccac cgggctgcgg cgaccccaag 300
 cgcctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccggttg cgtcgcctgtc 420
 tccgctgctg aggccactgt gccagcggc ccatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttctctct cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagccccggc ccgcggtctc cgccgtctcg atcacctacg gcacccccgtt cgcggcccg 600
 ggagcggact tccagcgct gccgggtggc agctccgccc cggtggtctc cctcggctta 660
 cagtaaatgt gcaccgcgcc gcccgagcgg gtccaggggc actggggccag ggaggcggc 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgatccct 780
 ggggctcccc gctgccagt cccagccggc gccgcccctg aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgctg tcccaccccc 900
 gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgt 1020
 gtcaacacac aggttggctt cgagtgcac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaaccaa ctagctacct ctgctctgc gccgaggct tcgcccctat tccccacgag 1200
 ccgacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggg 1380
 accttcgagt gcactctgcg gcccgactcg gcccttgtcc gccacattgg caccgactgt 1440
 gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcg cagccccgacg 1500
 cccggctcca ccttgactcc tccggcctg gggctcgtgc attcgggc 1548

10

<210> 11
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> humano

15

<400> 11

ES 2 743 767 T3

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
1 5 10 15
Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
20 25 30
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
35 40 45
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
50 55 60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
65 70 75 80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
85 90 95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
100 105 110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
115 120 125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
130 135 140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
145 150 155 160
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
165 170 175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
180 185 190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
195 200 205
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
210 215 220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
225 230 235 240
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
245 250 255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
260 265 270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
275 280 285
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
290 295 300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
305 310 315 320
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
325 330 335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
340 345 350
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
355 360 365
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
370 375 380
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
385 390 395 400
Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
405 410 415
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
420 425 430
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
435 440 445
Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
450 455 460
Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
465 470 475 480
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
485 490 495
Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
500 505 510
Val His Ser Gly
515

5 <210> 12
<211> 1548
<212> ADN

ES 2 743 767 T3

<213> humano

<400> 12

```
atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgcaacc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccg 120
ggccccgcga ccttctctcaa tgccagttag atctgcgacg gactgctggg ccacctaata 180
acagtgcgct cctcgggtggc tggcagatgc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttgcccgcc ggccgctctg gatcggcctg cagctgccac cgggctgctg cgaccccaag 300
cgcctcgggg ccctgcgcgg cttccagtgg gttacggggag acaacaacac cagctatagc 360
aggtgggcac ggctogacct caatggggct ccctctgctg gcccgttgtg cgtcgctgtc 420
tccgctgctg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
aaggccgatg gcttctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagcccgggc cggcggctgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccgct cgcgcccgcc 600
ggagcggact tccaggcgct gccgggtggc agctccgccc cgggtggctcc cctcggctta 660
cagctaatgt gcaccgcgcc gcccgagcgc gtcagggggc actgggcccag ggagggcgcc 720
ggcgcttggg actgagcgtg ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgcgatccct 780
ggggctcccc gctgccagt cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
accgatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgctg tccccacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccggctgc aggacgtgga tgactgcata ctggagcca gtccgtgtcc gcagcgtgtg 1020
gtcaaacacac aggggtggct cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacccaaa ctagctacct ctgctctgct gccgagggct tcgcccccat tccccacgag 1200
ccgcacaggt gccagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
acccaggcta gctgtgagt ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggg 1380
accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440
gactccggca agtgggacgg tggcgacagc ggctctggcg agcccccgcc cagccccgacg 1500
cccggctcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548
```

5

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 13

aatgtggcgg gcaagggccg a 21

15

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento que comprende trombomodulina como principio activo para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia.
2. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde la trombomodulina es una trombomodulina soluble.
- 5 3. El medicamento para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la trombomodulina es una trombomodulina humana.
4. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia es una o más clases de síntomas seleccionados entre entumecimiento de las extremidades, dolor de las extremidades, reducción del reflejo tendinoso profundo, reducción de fuerza muscular, alodinia, hiperalgesia y disfunción motora.
- 10 5. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el dolor neuropático periférico es alodinia.
6. El medicamento para uso según la reivindicación 5, en donde la alodinia es alodinia mecánica.
7. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en fármacos taxanos, preparaciones de platino y agentes alcaloides de la vinca.
- 15 8. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en fármacos taxanos y preparaciones de platino.
9. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en preparaciones de platino.
- 20 10. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa una o más clases de agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en fármacos taxanos.
11. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa oxaliplatino como agente anticancerígeno.
- 25 12. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa paclitaxel como agente anticancerígeno.
13. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la quimioterapia usa agentes anticancerígenos según la terapia FOLFOX o terapia FOLFIRI.
- 30 14. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el medicamento se administra intermitentemente.
15. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el medicamento se administra a un paciente con cáncer que padece una o más clases de cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma esofágico, leucemia, linfoma maligno, tumor pediátrico, mieloma múltiple, astrocitoma maligno, neuroglioma, enfermedad trofoblástica, tumor de células germinales, cáncer de pulmón, orquionco, cáncer vesical, tumor pélvico renal, uretrofima, cáncer de próstata, carcinoma del cérvix uterino, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, osteosarcoma, mesotelioma pleural maligno, osteonco maligno, y cáncer de colon.
- 35 16. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el medicamento se administra junto con un agente anticancerígeno.
17. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la trombomodulina es un péptido obtenible a partir de una célula transformada preparada transfectando una célula huésped con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de (i-1) o (i-2) mencionadas a continuación, y el péptido es un péptido que tiene las actividades de trombomodulina;
- 45 (i-1) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 u 11, o
- (i-2) la secuencia de aminoácidos de (i-1) mencionada anteriormente, que incluye además la sustitución, delección o adición de uno o más residuos de aminoácido.
- 50 18. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la trombomodulina es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de (i-1) o (i-2) mencionadas a continuación, y el péptido

es un péptido que tiene las actividades de trombomodulina;

(i-1) la secuencia de aminoácidos de las posiciones 19 a 516 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 u 11, o

(i-2) la secuencia de aminoácidos de (i-1) mencionada anteriormente, que incluye además la sustitución, delección o adición de uno o más residuos de aminoácido.

5

19. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde dicha trombomodulina se administra a un paciente intravenosamente.

20. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde dicha trombomodulina se administra a un paciente subcutáneamente.

10

21. El medicamento para uso según la reivindicación 19, en donde dicha trombomodulina se administra a un paciente en una dosis de 0,01 a 1 mg/kg/día.

22. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde dicho medicamento es para uso en el tratamiento profiláctico.

15

23. El medicamento para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde dicho medicamento es para uso en el tratamiento terapéutico.

Fig. 1

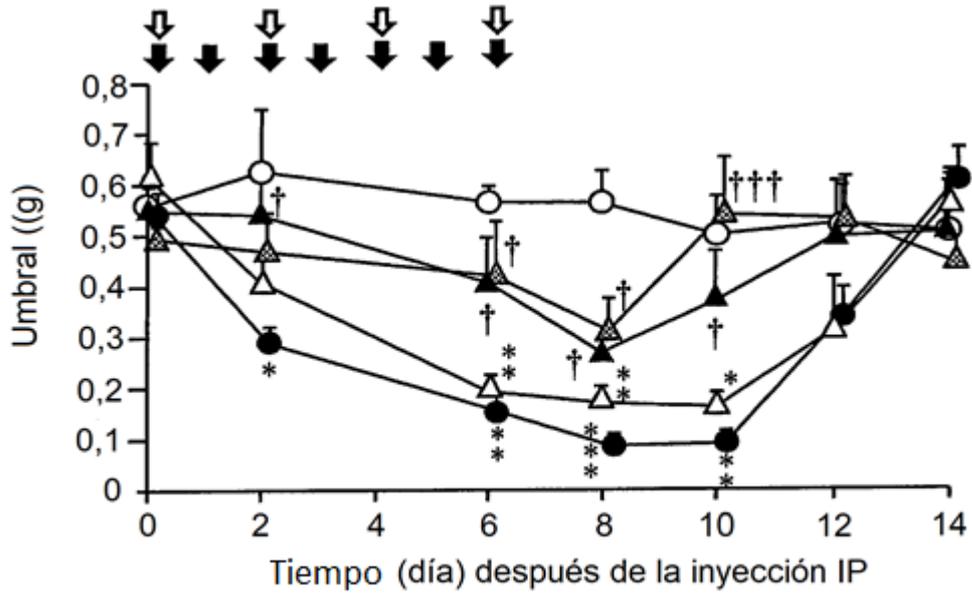


Fig. 2

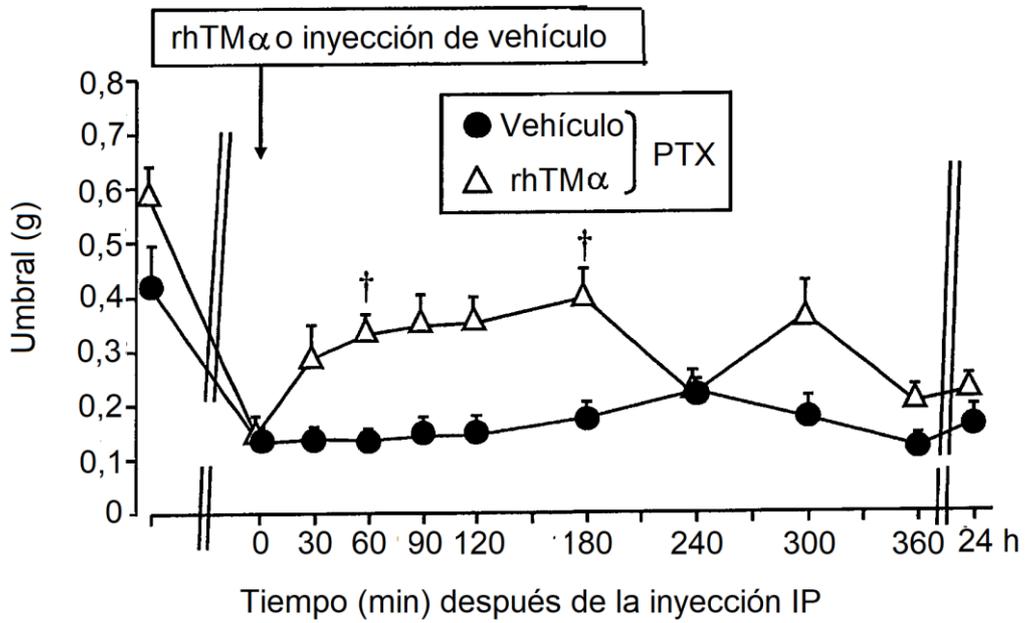


Fig. 3

