



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014148171/15, 17.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.05.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.05.2012 JP 2012-125316

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2016 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 27.08.2016 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2011/0212900 A1, 01.09.2011.
NURMIKKO TJ., et al., Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Pain. 2007 Dec 15;133(1-3):210-20. Epub 2007 Nov 7. ZHU J., et al., Repeated administration of mirtazapine inhibits development of hyperalgesia/allodynia and (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 31.12.2014

(86) Заявка РСТ:
JP 2013/063743 (17.05.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/179910 (05.12.2013)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

КАВАБАТА Ацуфуми (JP),
СУЗУКИ Хидеаки (JP)

(73) Патентообладатель(и):

КИНКИ ЮНИВЕРСИТИ (JP),
АСАХИ КАСЕИ ФАРМА
КОРПОРЕЙШН (JP)

(54) СРЕДСТВО ДЛЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО И/ИЛИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЧЕСКОЙ БОЛИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ПРОТИВОРАКОВЫМ СРЕДСТВОМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается лекарственного средства для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, индуцируемой химиотерапией, содержащего тромбомодулин в качестве активного

ингредиента. Группа изобретений также касается применения тромбомодулина для производства лекарственного средства для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, индуцируемой химиотерапией. Группа изобретений обеспечивает

профилактический и/или терапевтический эффект
в отношении периферической нейропатической
боли, индуцируемой химиотерапией,

характеризующийся быстроедействием и
долговременностью. 3 н. и 12 з.п. ф-лы, 3 ил., 13
пр.

(56) (продолжение):

activation of NF-kappaB in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 2008 Mar 5;433(1):33-7. doi: 10.1016/j.neulet.2007.12.037. Epub 2008 Jan 14. HAFER-MACKO CE., et al., Thrombomodulin deficiency in human diabetic nerve microvasculature. *Diabetes.* 2002 Jun;51(6):1957-63.

R U 2 5 9 5 8 5 7 C 2

R U 2 5 9 5 8 5 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)*A61P 25/04* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2014148171/15, 17.05.2013**(24) Effective date for property rights:
17.05.2013

Priority:

(30) Convention priority:
31.05.2012 JP 2012-125316(43) Application published: **20.07.2016** Bull. № 20(45) Date of publication: **27.08.2016** Bull. № 24(85) Commencement of national phase: **31.12.2014**(86) PCT application:
JP 2013/063743 (17.05.2013)(87) PCT publication:
WO 2013/179910 (05.12.2013)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JUrIdicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KAVABATA Atsufumi (JP),
SUZUKI KHideaki (JP)**

(73) Proprietor(s):

**KINKI YUNIVERSITI (JP),
ASAKHI KASEI FARMA KORPOREJSHN
(JP)**(54) **AGENT FOR PROPHYLACTIC AND/OR THERAPEUTIC TREATMENT OF PERIPHERAL NEUROPATHIC PAIN CAUSED BY ANTICANCER AGENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions concerns drug for prophylactic and/or therapeutic treatment of peripheral neuropathic pain, induced by chemotherapy containing thrombomodulin as active ingredient. Group of inventions also concerns using thrombomodulin for preparing drug for prophylactic and/or therapeutic

treatment of peripheral neuropathic pain, induced by chemotherapy.

EFFECT: group of inventions provides preventive and/or therapeutic effect on chemotherapy induced peripheral neuropathic pain, characterised by high speed and sustainability.

15 cl, 3 dwg, 13 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к лекарственному средству, оказывающему профилактический и/или терапевтический эффект в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством.

5 Предшествующий уровень техники

В терапевтическом лечении злокачественных новообразований (злокачественных опухолей) хирургическое лечение, лучевую терапию и химиотерапию соответствующим образом используют независимо или в комбинации. Противораковые средства (средства против злокачественных опухолей), используемые для химиотерапии злокачественных
10 новообразований наряду с терапевтическим лечением, указанным выше, исходно обладают цитотоксичностью и вызывают побочные реакции, повреждая не только раковые клетки (злокачественную опухоль), но также и нормальные клетки.

Примеры побочных реакций, вызываемых противораковыми средствами, включают нарушения крови, обструкции органов пищеварения и нейропатию, но в последние
15 годы все более серьезной становится проблема острой или хронической нейропатии. Считают, что это происходит по причине значительных побочных реакций, вызываемых появляющимися на рынке противораковыми средствами, при этом во многих случаях отмечают нейропатию в качестве противоракового эффекта, развитие нейропатии усиливается под влиянием комбинированной терапии множеством лекарственных
20 средств, такой как терапия FOLFOX, и такие побочные реакции, как нарушения крови и обструкция органов пищеварения, имеют тенденцию к улучшению. В современных условиях для контроля такой нейропатии, вызываемой противораковыми средствами, необходимо снижать дозы противораковых средств или прекращать противораковую химиотерапию.

Нейропатии, вызываемые противораковыми средствами, также наблюдают в органах чувств, таких как органы вкуса, а также в центральной нервной системе, вегетативной
25 нервной системе и периферической нервной системе. Среди них очень часто развиваются периферические нейропатии, например, боли, такие как интенсивная боль и жгучая боль, онемение дистальных отделов конечностей, аномальные ощущения, такие как
30 холодовая гиперчувствительность, дизестезии, такие как анестезия и сенсорный паралич, сенсорная атаксия, снижение мышечной силы и т.п., и, в особенности, в качестве типичных симптомов проблемы вызывают холодовая аллодиния и механическая аллодиния. Примеры противораковых средств, часто вызывающих такие периферические нейропатии, включают таксановые лекарственные средства (паклитаксел, доцетаксел),
35 лекарственные средства на основе алкалоида барвинка (винкристин, винбластин, виндезин, винорелбин) и препараты платины (оксалиплатин, цисплатин).

В настоящее время не разработаны какие-либо эффективные способы профилактического и терапевтического лечения периферических нейропатий, вызываемых противораковыми средствами, особенно, аллодинии. Хотя в случае
40 периферических нейропатий, вызываемых оксалиплатином, сообщают о применимости внутривенного введения кальция и магния или глутатиона, их трудно использовать, т.к., например, такая терапия дополнительно осложняет противораковую химиотерапию, и для таких веществ необходимо массированное введение. В клинической практике необходимость контролировать периферические нейропатии, вызываемые
45 противораковыми средствами, с помощью физиотерапии, дополнительных способов терапии, таких как массаж и акупунктура, или комбинации медикаментозных способов терапии, таких как использование стероидов, антидепрессантов, антиконвульсантов и опиоидов, является нежелательной, при этом эффективность этих способов терапии не

проверена, и такие способы терапии сами по себе часто вызывают побочные реакции (непатентные документы 1 и 2).

Тромбомодулин известен как вещество, действующее, специфически связываясь с тромбином, таким образом, ингибируя прокоагулянтную активность тромбина и, в то же время, проявляя антикоагулянтную активность, таким образом, значительно усиливая способность тромбина активировать протеин С. Тромбомодулин впервые открыли и получили как гликопротеин, экспрессирующийся на клетках эндотелия сосудов различных видов животных, включая людей, и, что касается его структуры, он состоит из 5 областей, а именно, начиная с N-конца белка, N-концевой области (аминокислотные остатки 1-226), области, имеющей шесть EGF-подобных структур (аминокислотные остатки 227-462), области О-сцепленного гликозилирования (аминокислотные остатки 463-497), трансмембранной области (аминокислотные остатки 498-521) и цитоплазматической области (аминокислотные остатки 522-557) (непатентный документ 3).

Полноразмерный тромбомодулин труднорастворим в отсутствие поверхностно-активного вещества, и для производства препарата полноразмерного тромбомодулина необходимо его добавление. Также доступен растворимый тромбомодулин, который может полностью растворяться даже в отсутствие поверхностно-активного вещества. Растворимый тромбомодулин можно получать, удаляя, по меньшей мере, часть трансмембранной области или всю трансмембранную область. Например, подтверждено, что растворимый тромбомодулин, состоящий только из 3 областей, а именно, N-концевой области, области с шестью EGF-подобными структурами и области О-сцепленного гликозилирования (т.е. растворимый тромбомодулин, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотных остатков 19-516 в SEQ ID NO:9), можно получать, используя рекомбинантные способы, и что получаемый рекомбинантный растворимый тромбомодулин имеет ту же активность, что и природный тромбомодулин (патентный документ 1). Также приводят примеры тромбомодулинов, получаемых из мочи человека и т.п. (патентный документ 2).

Как признают во многих случаях, в генах человека обнаружены полиморфные мутации, представляющие собой спонтанные мутации или мутации, возникающие при их получении. К настоящему времени идентифицированы тромбомодулиновые белки, в которых аминокислота в положении 473 предшественника тромбомодулина человека, имеющего аминокислотную последовательность, состоящую из 575 аминокислотных остатков, преобразована в Val или Ala. В нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, этот вариант аминокислотного остатка соответствует мутации в Т или С в положении 1418 (непатентный документ 3). Однако, два типа тромбомодулинов полностью идентичны в отношении их активности и физико-химических свойств, и можно считать, что они являются, по существу, идентичными.

Что касается предполагаемого применения тромбомодулина, в настоящее время предполагают применение вещества в терапевтическом и профилактическом лечении заболеваний, например, инфаркта миокарда, тромбоза (например, тромбоза сосудов головного мозга в острой стадии или хронической стадии, острого или хронического тромбоза периферических артерий или вен и т.п.), эмболии (например, церебральной эмболии в острой стадии или хронической стадии, острой или хронической эмболии периферических артерий или вен и т.п.), обструкции периферических сосудов (например, болезни Бюргера, болезни Рейно и т.п.), обструктивного атеросклероза, функциональных обструкций, развивающихся после операций на сердце, осложнений трансплантации

органов, диссеминированного внутрисосудистого свертывания (DIC), стенокардии, транзиторной ишемической атаки, токсикоза при беременности, тромбоза глубоких вен (DVT) и т.п. Кроме того, примеры подходящих заболеваний, иных, чем сопровождающиеся гиперкоагуляцией, таких как тромбоз и DIC, включают повреждения
 5 печени (патентный документ 4), абсорбционные заболевания костей (патентный документ 5), заживление ран (патентный документ 6) и т.п. Кроме того, что касается применения тромбомодулина совместно с другими активными ингредиентами, описывают заживление ран (патентный документ 7), защиту тканей мозга (патентный документ 8) и т.п. Кроме того, описывают применение тромбомодулина в
 10 терапевтическом и профилактическом лечении боли при трансплантации гематопозитических клеток (патентный документ 9).

Ссылки на известный уровень техники

Патентные документы

Патентный документ 1: Нерассмотренная патентная публикация Японии (KOKAI)
 15 № 64-6219

Патентный документ 2: Нерассмотренная патентная публикация Японии № 3-86900

Патентный документ 3: WO 92/00325

Патентный документ 4: Нерассмотренная патентная публикация Японии № 8-3065

Патентный документ 5: Нерассмотренная патентная публикация Японии № 8-301783

20 Патентный документ 6: Нерассмотренная патентная публикация Японии № 9-20677

Патентный документ 7: патент США № 5976523

Патентный документ 8: патент США № 5827832

Патентный документ 9: Нерассмотренная патентная публикация Японии № 2012-001543

25 Непатентные документы

Непатентный документ 1: NCI Cancer Bulletin, 2010, Feb. 23, 7 (4)

Непатентный документ 2: Folia Pharmacologica Japonica (Nippon Yakurigaku Zasshi),
 2010, 136:275-279

Непатентный документ 3: EMBO Journal, 1987, 6:1891-1897

30 Сущность изобретения

Цель, которая должна быть достигнута с помощью изобретения

Целью настоящего изобретения является получение лекарственного средства, делающего возможным эффективное профилактическое и/или терапевтическое лечение периферической нейропатической боли, вызываемой противораковыми средствами.

35 Средства достижения цели

Авторы настоящего изобретения решительно признают текущую ситуацию как проблему, решение которой в случае нейропатии, вызываемой противораковым средством, направлено на снижение дозы противоракового средства или прекращение введения противоракового средства, и к настоящему времени не разработано какое-
 40 либо эффективное профилактическое и терапевтическое лечение нейропатии, вызываемой противораковым средством, и они считают, что важной целью является получение лекарственного средства для эффективного профилактического и/или терапевтического лечения нейропатии, вызываемой противораковым средством, особенно периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым
 45 средством. Это связано с тем, что авторы настоящего изобретения считают, что периферическая нейропатическая боль, вызываемая противораковым средством, затрудняет повседневную деятельность пациентов и представляет собой наиболее значимую причину прекращения терапевтического лечения злокачественного

новообразования, и, таким образом, решение проблемы аллодинии, вызываемой противораковым средством, является важным для терапевтического лечения злокачественного новообразования не только для улучшения качества жизни пациентов, но также и с точки зрения продолжения терапевтического лечения злокачественного новообразования.

Для достижения указанной выше цели авторы настоящего изобретения осуществляли различные исследования. В результате, они неожиданно обнаружили, что тромбомодулин оказывает превосходный профилактический и/или терапевтический эффект в отношении периферической нейропатической боли, особенно аллодинии, вызываемой противораковым средством, и осуществляли настоящее изобретение. До настоящего времени не сообщали и не предлагали какого-либо профилактического и/или терапевтического лечения нейропатии, вызываемой противораковым средством, особенно периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, с использованием тромбомодулина. Хотя в патентном документе 9 описывают, что тромбомодулин оказывает эффект в отношении боли, сопровождающейся повышением массы в результате отека, объема асцита или т.п., вызываемых премедикацией перед трансплантацией гематopoэтических клеток, в документе никак не упоминают периферическую нейропатическую боль, вызываемую противораковым средством.

Таким образом, настоящее изобретение относится к следующему.

[1] Лекарственное средство для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, содержащее тромбомодулин в качестве активного ингредиента.

[2] Лекарственное средство по указанному выше п.[1], где тромбомодулин является растворимым тромбомодулином.

[3] Лекарственное средство по указанному выше п.[1], где тромбомодулин является тромбомодулином человека.

[4] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[3], где периферическая нейропатическая боль представляет собой один или несколько типов симптомов, выбранных из онемения конечностей, боли в конечностях, снижения глубоких рефлексов сухожилий, снижения мышечной силы, аллодинии, гипералгезии и двигательной дисфункции.

[5] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[4], где периферическая нейропатическая боль является аллодинией.

[6] Лекарственное средство по указанному выше п.[5], где аллодиния является механической аллодинией.

[6-2] Лекарственное средство по указанному выше п.[5], где аллодиния является холодовой аллодинией.

[7] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[6-2], где противораковое средство состоит из одного или нескольких типов средств, выбранных из группы, состоящей из таксанового лекарственного средства и препарата платины.

[7-2] Лекарственное средство по указанному выше п.[7], где таксановое лекарственное средство состоит из одного или нескольких типов лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из паклитаксела и доцетаксела.

[7-3] Лекарственное средство по указанному выше п.[7], где препарат платины состоит из одного или нескольких типов препаратов, выбранных из группы, состоящей из оксалиплатина, цисплатина, карбоплатина и недаплатина.

[8] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[6-2], где

противораковым средством является паклитаксел.

[8-2] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[6-2], где противораковым средством является оксалиплатин.

5 [9] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[6-2], где противораковое средство вводят в соответствии с терапией FOLFOX или терапией FOLFIRI.

[10] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[9], где тромбомодулин вводят периодически.

10 Если процитированные номера пунктов представлены в виде диапазона, такого как [1]-[9], как указано выше, и в диапазон включают указанный пункт с номером пункта, имеющим субномер, такой как [7-2], это означает, что также цитируют указанный пункт с номером пункта, имеющим субномер, такой как [7-2]. Это правило также справедливо для следующего описания.

15 [10-2] Лекарственное средство по указанному выше п.[10], где периодическое введение является введением раз в неделю.

[10-3] Лекарственное средство по указанному выше п.[10], где периодическое введение является ежедневным введением.

[10-4] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[9], где тромбомодулин вводят раз в неделю.

20 [10-5] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[9], где тромбомодулин вводят каждый день.

[11] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[10-5], которое вводят пациенту со злокачественным новообразованием, страдающему одним или несколькими типами злокачественных новообразований, выбранных из группы, состоящей из рака яичников, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака желудка, рака эндометрия, рака головы и шеи, карциномы пищевода, лейкоза, злокачественной лимфомы, опухоли детского возраста, множественной миеломы, злокачественной астроцитомы, нейроглиомы, трофобластической опухоли, герминогенной опухоли, рака легких, опухоли яичка, рака мочевого пузыря, опухоли почечной лоханки, опухоли мочеиспускательного канала, рака предстательной железы, карциномы шейки матки, нейробластомы, мелкоклеточного рака легких, остеосаркомы, злокачественной мезотелиомы плевры, злокачественной остеомы и рака толстого кишечника.

35 [12] Лекарственное средство для совместного введения с противораковым средством для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, содержащее тромбомодулин в качестве активного ингредиента.

[12-2] Лекарственное средство по указанному выше п.[12], где противораковым средством является таксановое лекарственное средство или препарат платины.

40 [12-3] Лекарственное средство по указанному выше п.[12], где противораковым средством является паклитаксел.

[12-4] Лекарственное средство по указанному выше п.[12], где противораковым средством является оксалиплатин.

45 [13] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[12-4], где тромбомодулин является пептидом, получаемым из трансформированной клетки, полученной трансфекцией клетки-хозяина с использованием ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность по указанным ниже пп.(i-1) или (i-2), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина;

(i-1) аминокислотная последовательность SEQ ID NO:9 или 11, или

(i-2) аминокислотная последовательность по указанному выше п.(i-1), дополнительно включающая замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков.

5 [13-2] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[12-4], где тромбомодулин является пептидом, получаемым из трансформированной клетки, полученной трансфекцией клетки-хозяина с использованием ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность по указанному ниже п.(i-1), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина;

10 (i-1) аминокислотная последовательность SEQ ID NO:9 или 11.

[14] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[12-4], где тромбомодулин является пептидом, содержащим аминокислотную последовательность по указанным ниже пп.(i-1) или (i-2), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина;

15 (i-1) аминокислотная последовательность в положениях 19-516 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11, или

(i-2) аминокислотная последовательность по указанному выше п.(i-1), дополнительно включающая замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков.

20 [14-2] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[12-4], где тромбомодулин является пептидом, содержащим аминокислотную последовательность по указанному ниже п.(i-1), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина;

25 (i-1) аминокислотная последовательность в положениях 19-516 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11.

[14-3] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[12-4], где тромбомодулин является пептидом, содержащим:

30 (i) аминокислотную последовательность в положениях 367-480 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11, и аминокислотную последовательность по указанным ниже пп.(ii-1) или (ii-2), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина:

(ii-1) аминокислотную последовательность в положениях 19-244 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11, или

35 (ii-2) аминокислотную последовательность по указанному выше п.(ii-1), дополнительно включающую замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков.

[14-4] Лекарственное средство по любому из указанных выше пп.[1]-[12-4], где тромбомодулин является пептидом, содержащим:

40 (i) аминокислотную последовательность в положениях 367-480 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11, и аминокислотную последовательность по указанному ниже п.(ii-1), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина:

(ii-1) аминокислотную последовательность в положениях 19-244 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11.

45 [15] Способ профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, включающий этап введения тромбомодулина млекопитающему.

[15-2] Способ по указанному выше п.[15], имеющий одну или несколько характерных

черт, определенных в указанных выше пп.[1]-[14-4].

[16] Применение тромбомодулина для производства лекарственного средства для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством.

5 [16-2] Применение по указанному выше п.[16], имеющее одну или несколько характерных черт, определенных в указанных выше пп.[1]-[14-4].

[17] Способ профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, у млекопитающего, которому вводят противораковое средство, включающий этап введения тромбомодулина
10 млекопитающему.

[17-2] Способ по указанному выше п.[17], имеющий одну или несколько характерных черт, определенных в указанных выше пп.[1]-[14-4].

[17-3] Способ по указанному выше п.[17], включающий этап введения тромбомодулина млекопитающему одновременно с противораковым средством или
15 в разные моменты времени.

Эффект изобретения

Настоящее изобретение делает возможным эффективное профилактическое и/или терапевтическое лечение периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством. До настоящего времени для контроля периферической
20 нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, необходимым являлось нежелательное снижение дозы противоракового средства или прекращение химиотерапии злокачественного новообразования. Настоящее изобретение делает возможным продолжение соответствующей химиотерапии злокачественного новообразования и вносит вклад в улучшение качества жизни пациентов.

25 Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены результаты исследования профилактического эффекта тромбомодулина в отношении механической аллодинии, вызываемой введением паклитаксела, исследование осуществляли согласно тесту фон Фрея.

Белая стрелка вниз: Введение 4 мг/кг паклитаксела

30 Черная стрелка вниз: Введение TMD123

о: Группа введения растворителя

•: Группа введения RTX

Δ: Группа введения RTX + 0,1 мг/кг TMD123

Серая Δ: Группа введения RTX + 1 мг/кг TMD123

35 Черная Δ: Группа введения RTX + 10 мг/кг TMD123

*: $p < 0,05$

** : $p < 0,01$ (сравнение с группой введения растворителя)

†: $p < 0,05$

40 †††: $p < 0,001$ (сравнение с группой введения RTX)

На фиг. 2 представлены результаты исследования терапевтического эффекта тромбомодулина в отношении механической аллодинии, вызываемой введением паклитаксела, исследование осуществляли согласно тесту фон Фрея, как и исследование, результаты которого представлены на фиг. 1.

45 •: Группа введения RTX

Δ: Группа введения RTX + 10 мг/кг TMD123

†: $p < 0,05$ (сравнение с группой введения RTX)

rhTMα: TMD123

На фиг. 3 представлены результаты исследования терапевтического эффекта тромбомодулина в отношении механической аллодинии, вызываемой введением паклитаксела, исследование осуществляли согласно тесту Рэндалла-Селитто с использованием крыс, как и исследование, результаты которого представлены на фиг. 1.

Белая стрелка вниз: Введение 2 мг/кг паклитаксела

Черная стрелка вниз: Введение TMD123

о: Группа введения растворителя

■: Группа введения РТХ

Δ: Группа введения РТХ + 10 мг/кг TMD123

□*: $p < 0,05$

□□**: $p < 0,01$ (сравнение с группой введения растворителя)

†: $p < 0,05$

†††: $p < 0,01$ (сравнение с группой введения РТХ)

Способы осуществления изобретения

Далее конкретно объясняют несколько предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения (предпочтительных способов осуществления изобретения, далее в описании также обозначаемых как "варианты осуществления"). Однако объем настоящего изобретения не ограничен приведенными ниже конкретными вариантами осуществления.

Примеры тромбомодулина, применимого в качестве активного ингредиента лекарственного средства для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, по этому варианту осуществления, включают растворимый тромбомодулин.

Предпочтительно, о тромбомодулине по этому варианту осуществления известно, что он имеет действия (1) избирательного связывания с тромбином (2) для стимуляции активации протеина С тромбином. Кроме того, предпочтительным является подтверждение того, что тромбомодулин, как правило, имеет (3) действие по повышению тромбинового времени, (4) действие по супрессии агрегации тромбоцитов, вызываемой тромбином, и/или (5) противовоспалительное действие. Такие действия, которыми обладает тромбомодулин, можно обозначать как функции тромбомодулина.

Что касается функций тромбомодулина, тромбомодулин предпочтительно оказывает указанные выше действия (1) и (2) и, более предпочтительно, оказывает указанные выше действия (1)-(4). Что касается функций тромбомодулина, тромбомодулин более предпочтительно оказывает все из указанных выше действий (1)-(5).

Действие тромбомодулина по связыванию с тромбином можно подтверждать способами исследования, описываемыми в различных известных публикациях, таких как Thrombosis and Haemostasis, 1993, 70(3):418-422 и The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264, 9, pp.4872-4876. Что касается действия по стимуляции активации протеина С тромбином, степень активности стимуляции активации протеина С тромбином или наличие или отсутствие действия можно легко подтверждать способами исследования, четко описываемыми в различных известных публикациях включая, например, нерассмотренную патентную публикацию Японии № 64-6219. Кроме того, аналогично можно легко подтверждать действие по повышению тромбинового времени и/или действие по супрессии агрегации тромбоцитов, вызываемой тромбином. Кроме того, противовоспалительное действие также можно подтверждать способами исследования,

описываемыми в различных известных публикациях, включая, например, Blood, 2008, 112:3361-3670 и The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115, 5:1267-1274.

Тромбомодулин, используемый в этом варианте осуществления, в частности, не ограничен при условии, что он имеет функции тромбомодулина, но тромбомодулин предпочтительно является растворимым тромбомодулином, растворимым в воде в условиях отсутствия поверхностно-активных веществ.

Растворимость растворимого тромбомодулина в воде, такой как дистиллированная вода, используемая для инъекций (в отсутствие поверхностно-активного вещества, такого как Triton X-100 или полидоканол, и, как правило, приблизительно в нейтральном диапазоне pH), предпочтительно составляет, например, 1 мг/мл или более, или 10 мг/мл или более, предпочтительно - 15 мг/мл или более или 17 мг/мл или более, более предпочтительно - 20 мг/мл или более, 25 мг/мл или более или 30 мг/мл или более; особенно предпочтительно - 60 мг/мл или более. В некоторых случаях растворимость составляет, например, 80 мг/мл или более или 100 мг/мл или более. Для определения того, успешно ли растворился растворимый тромбомодулин в воде, следует понимать, что после растворения растворимого тромбомодулина в воде и визуального осмотра раствора, например, при дневном свете в положении, соответствующем освещенности приблизительно 1000 люксов, в качестве простых критериев служат прозрачный внешний вид раствора и отсутствие очевидно наблюдаемых нерастворимых веществ. Также можно наблюдать наличие или отсутствие какого-либо остатка после фильтрации.

Молекулярная масса тромбомодулина не ограничена при условии, что он имеет функции тромбомодулина, как описано выше. Молекулярная масса предпочтительно составляет 100000 или менее, более предпочтительно - 90000 или менее, еще более предпочтительно - 80000 или менее, наиболее предпочтительно - 70000 или менее, и молекулярная масса предпочтительно составляет 50000 или более, наиболее предпочтительно - 60000 или более. Молекулярную массу растворимого тромбомодулина легко можно измерять общепринятыми способами измерения молекулярной массы белка. Предпочтительным является измерение с помощью масс-спектрометрии, и более предпочтительным является способ MALDITOF-MS. Для получения растворимого тромбомодулина, имеющего молекулярную массу в желаемом диапазоне, растворимый тромбомодулин, получаемый культивированием трансформированной клетки, полученной трансфекцией клетки-хозяина с помощью вектора с использованием ДНК, кодирующей растворимый тромбомодулин, можно подвергать фракционированию с использованием хроматографии на колонке или т.п., как описано ниже.

Тромбомодулин, используемый для настоящего варианта осуществления, предпочтительно, содержит аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотных остатков в положениях 19-132 SEQ ID NO:1, известную как центральную часть, ответственную за функции тромбомодулина человека, и тромбомодулин, в частности, не ограничен при условии, что тромбомодулин содержит аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотных остатков в положениях 19-132 SEQ ID NO:1. Аминокислотная последовательность, состоящая из аминокислотных остатков в положениях 19-132 SEQ ID NO:1, может подвергаться природному или искусственному мутагенезу при условии, что последовательность оказывает действие, стимулирующее активацию протеина С тромбином, а именно, имеет одну из функций тромбомодулина. Конкретно, последовательность может содержать замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности, состоящей из аминокислотных

остатков в положениях 19-132 SEQ ID NO:1. Приемлемый уровень мутаций, в частности, не ограничен при условии, что аминокислотная последовательность имеет функции тромбомодулина. Пример включает гомологию аминокислотных последовательностей 50% или более, и гомология составляет предпочтительно 70% или более, более предпочтительно - 80% или более, более предпочтительно - 90% или более, особенно предпочтительно - 95% или более, и наиболее предпочтительно - 98% или более. Такую мутантную аминокислотную последовательность, включающую замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков, обозначают как гомологичную мутантную последовательность. Как описано ниже, эти мутантные аминокислотные последовательности легко можно получать с использованием общепринятых способов генной инженерии. Тромбомодулин, в частности, не ограничен при условии, что он имеет указанную выше последовательность и оказывает действие по избирательному связыванию с тромбином для стимуляции активации протеина С тромбином, по меньшей мере, как целый тромбомодулин, но тромбомодулин, предпочтительно, также имеет противовоспалительное действие.

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO:3 содержит мутацию Val, как аминокислоты в положении 125 последовательности SEQ ID NO:1, в Ala. Используемый в настоящем изобретении тромбомодулин, предпочтительно, также содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-132 SEQ ID NO:3.

Как описано выше, хотя используемый в настоящем изобретении тромбомодулин, в частности, не ограничен при условии, что тромбомодулин имеет, по меньшей мере, аминокислотную последовательность в положениях 19-132 SEQ ID NO:1 или 3 или гомологичную им мутантную последовательность и содержит, по меньшей мере, пептидную последовательность, имеющую функции тромбомодулина, предпочтительные примеры тромбомодулина включают пептид, состоящий из последовательности в положениях 19-132 или 17-132 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, и пептид, состоящий из мутантной последовательности, гомологичной указанной выше последовательности, и имеющий, по меньшей мере, функции тромбомодулина. Более предпочтительным является пептид, состоящий из последовательности в положениях 19-132 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления более предпочтительным является пептид, состоящий из мутантной последовательности, гомологичной последовательности в положениях 19-132 или 17-132 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3, и имеющий, по меньшей мере, функции тромбомодулина.

В качестве другого варианта осуществления тромбомодулина, используемого в этом варианте осуществления, тромбомодулин предпочтительно содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:5, в частности, не ограниченную при условии, что тромбомодулин содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:5. Аминокислотная последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:5 может являться ее гомологичной мутантной последовательностью при условии, что последовательность оказывает действие, стимулирующее активацию протеина С тромбином, т.е. имеет одну из функций тромбомодулина.

Последовательность SEQ ID NO:7 содержит мутацию Val, в качестве аминокислоты в положении 473 последовательности SEQ ID NO:5, в Ala. Используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин, предпочтительно, также содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:7.

Как описано выше, хотя используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин, в частности, не ограничен при условии, что тромбомодулин имеет, по меньшей мере, последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7

или гомологичную им мутантную последовательность и содержит, по меньшей мере, пептидную последовательность, имеющую функции тромбомодулина, предпочтительные примеры тромбомодулина включают пептид, состоящий из последовательности в положениях 19-480 или 17-480 SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7, и пептид, состоящий из мутантной последовательности, гомологичной указанной выше последовательности, и имеющий, по меньшей мере, функции тромбомодулина. Более предпочтительным является пептид, состоящий из последовательности в положениях 19-480 SEQ ID NO:5 или 7. В другом варианте осуществления более предпочтительным является пептид, состоящий из мутантной последовательности, гомологичной последовательности в положениях 19-480 или 17-480 SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7, и имеющий, по меньшей мере, функции тромбомодулина.

В качестве другого варианта осуществления тромбомодулина, используемого в этом варианте осуществления, тромбомодулин, предпочтительно, содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:9, в частности, не ограниченную при условии, что тромбомодулин содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:9. Аминокислотная последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:9 может являться гомологичной ей мутантной последовательностью при условии, что последовательность оказывает действие, стимулирующее активацию протеина С тромбином, т.е. имеет одну из функций тромбомодулина.

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO:11 содержит мутацию Val, как аминокислоты в положении 473 SEQ ID NO:9, в Ala. Используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин, предпочтительно, также содержит аминокислотную последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:11.

Как описано выше, хотя используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин, в частности, не ограничен при условии, что тромбомодулин имеет, по меньшей мере, последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11 или гомологичную им мутантную последовательность и содержит пептидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, функции тромбомодулина, более предпочтительные примеры включают пептид, имеющий последовательность в положениях 19-516, 19-515, 17-516 или 17-515 SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11, и пептид, состоящий из мутантной последовательности, гомологичной указанной выше последовательности, и имеющий, по меньшей мере, функции тромбомодулина. Особенно предпочтительным является пептид, имеющий последовательность в положениях 19-516, 19-515, 17-516 или 17-515 SEQ ID NO:9. Их смесь также является предпочтительным примером. В другом варианте осуществления особенно предпочтительным является пептид, имеющий последовательность в положениях 19-516, 19-515, 17-516 или 17-515 SEQ ID NO:11. Их смесь также является предпочтительным примером. Кроме того, пептид, состоящий из гомологичной им мутантной последовательности и имеющий, по меньшей мере, функции тромбомодулина, также является предпочтительным примером. Предпочтительно, чтобы растворимый тромбомодулин также имел противовоспалительное действие.

Пептид, имеющий гомологичную мутантную последовательность, является таким, как описано выше, и означает пептид, который может содержать замену, делецию или инсерцию по меньшей мере одного, а именно, одного или нескольких, предпочтительно - нескольких (например, от 1 до 20, предпочтительно - от 1 до 10, более предпочтительно - от 1 до 5, особенно предпочтительно - от 1 до 3) аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности представляемого пептида. Хотя приемлемый уровень мутаций, в частности, не ограничен при условии, что пептид имеет функции

тромбомодулина, пример приемлемого уровня гомологии включает 50% или более аминокислотных последовательностей, и гомология может составлять предпочтительно 70% или более, более предпочтительно - 80% или более, более предпочтительно - 90% или более, особенно предпочтительно - 95% или более, и наиболее предпочтительно - 98% или более.

Предпочтительные примеры используемого в этом варианте осуществления тромбомодулина также включают пептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO:14 (462 аминокислотных остатка), пептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO:8 (272 аминокислотных остатка), и пептид, состоящий из последовательности SEQ ID NO:6 (236 аминокислотных остатков), описываемых в нерассмотренной патентной публикации Японии № 64-6219.

Используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин, в частности, не ограничен при условии, что тромбомодулин имеет, по меньшей мере, аминокислотную последовательность в положениях 19-132 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3. В качестве такого тромбомодулина предпочтительным является пептид, имеющий, по меньшей мере, аминокислотную последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:7, и наиболее предпочтительным является пептид, имеющий, по меньшей мере, аминокислотную последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11. Более предпочтительным примером пептида, имеющего, по меньшей мере, аминокислотную последовательность в положениях 19-515 SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11, является пептид, имеющий последовательность в положениях 19-516, 19-515, 19-514, 17-516, 17-515 или 19-514 SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11. Кроме того, смесь пептидов, каждый из которых состоит из последовательности в положениях 19-516, 19-515, 19-514, 17-516, 17-515 или 19-514 SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11, также является предпочтительным примером.

В случае указанной выше смеси соотношение компонентов смеси пептида, начинающегося с положения 17, и пептида, начинающегося с положения 19, для каждой из SEQ ID NO:9 и 11, составляет, например, от 30:70 до 50:50, предпочтительно - от 35:65 до 45:55.

Кроме того, соотношение компонентов смеси пептида, оканчивающегося в положении 514, пептида, оканчивающегося в положении 515, и пептида, оканчивающегося в положении 516, для каждой из SEQ ID NO:9 и 11, при желании, составляет, например, от 0:0:100 до 0:90:10 или от 0:70:30 до 10:90:0, или от 10:0:90 до 20:10:70.

Соотношение компонентов смеси пептидов можно определять общепринятым способом.

Последовательность в положениях 19-132 SEQ ID NO:1 соответствует последовательности в положениях 367-480 SEQ ID NO:9, и последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:5 соответствует последовательности в положениях 19-480 SEQ ID NO:9. Кроме того, последовательность в положениях 19-132 SEQ ID NO:3 соответствует последовательности в положениях 367-480 SEQ ID NO:11, и последовательность в положениях 19-480 SEQ ID NO:7 соответствует последовательности в положениях 19-480 SEQ ID NO:11. Кроме того, все последовательности в положениях 1-18 в SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 и 11 являются идентичными последовательностями.

Как описано ниже, эти тромбомодулины, используемые в этом варианте осуществления, можно получать из трансформированных клеток, полученных трансфекцией клеток-хозяев с помощью вектора с использованием ДНК, кодирующей пептид (в частности, нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12 и т.п.).

Достаточно того, что эти пептиды имеют только указанные выше аминокислотные последовательности, и можно присоединять или не присоединять цепь сахара, являющуюся, в частности, неограниченной. В способах генной инженерии тип цепи сахара, положение, в которое добавляют цепь сахара, и уровень его добавления

5 отличаются в зависимости от типа используемых клеток-хозяев, и можно использовать любые способы. Что касается положения связывания цепи сахара и ее типа, известны факты, описываемые в нерассмотренной патентной публикации Японии № 11-341990, и можно добавлять используемые в этом варианте осуществления тромбомодулины с одинаковой цепью сахара в одинаковом положении. С тромбомодулином по этому

10 варианту осуществления можно связывать два типа N-связанных цепей сахаров, фукозильного 2-антенарного типа и фукозильного 3-антенарного типа, и соотношение между ними составляет, например, от 100:0 до 60:40, предпочтительно - от 95:5 до 60:40, более предпочтительно - от 90:10 до 70:30. Соотношение цепей этих сахаров можно измерять с помощью двухмерной карты цепей сахаров, описываемой в Biochemical

15 Experimental Methods, Vol.23, Methods of Researches on Glycoprotein Sugar Chains, Japan Scientific Societies Press (1990), и т.п. Кроме того, при исследовании композиции сахаров тромбомодулина по этому варианту осуществления определяют нейтральные сахараиды, аминсахарида и сиаловую кислоту, содержание которых, независимо друг от друга, может составлять, например, от 1 до 30%, предпочтительно - от 2 до 20%, более

20 предпочтительно - от 5 до 10%, в терминах массового соотношения с учетом содержания белка. Содержание сахаров можно измерять способами, описываемыми в Lecture of New Biochemical Experiments, Vol.3, Sugar I, Glycoprotein (Book 1), Tokyo Kagaku Dojin (1990) (нейтральные сахараиды: способ с использованием фенола и серной кислоты, аминсахарида: способ Элсона-Моргана, сиаловая кислота: способ с использованием

25 йодной кислоты и резорцина).

Хотя способ получения тромбомодулина не ограничен его получением с помощью генетических манипуляций, как описано далее, в качестве сигнальной последовательности, которую можно использовать для экспрессии при получении

тромбомодулина способами генной инженерии, можно использовать нуклеотидную

30 последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность в положениях 1-18 SEQ ID NO:9, и нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность в положениях 1-16 SEQ ID NO:9, а также можно использовать другие известные сигнальные последовательности, такие как сигнальная последовательность тканевого активатора плазминогена человека (международная

35 публикация WO 88/9811).

Если последовательность ДНК, кодирующую тромбомодулин, встраивают в клетку-хозяина, примеры предпочтительных способов включают способ встраивания последовательности ДНК, кодирующей тромбомодулин, предпочтительно, в вектор, более предпочтительно - экспрессирующий вектор, способный экспрессироваться в

40 клетках животных, а затем встраивания ДНК с использованием вектора. Экспрессирующий вектор является молекулой ДНК, состоящей из последовательности промотора, последовательности для добавления участка связывания рибосомы с мРНК, последовательности ДНК, кодирующей белок, подлежащий экспрессии, сигнала для сплайсинга, последовательности терминатора для терминации транскрипции,

45 последовательности точки начала репликации и т.п. Примеры предпочтительных экспрессирующих векторов для клеток животных включают pSV2-X, описываемый Mulligan R.C. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 2072-2076); pBP69T (69-6), описываемый Howley P.M. et al. (Methods in Emzymology, 1983, 101, 387-402, Academic

Press), и т.п. Кроме того, также существует другой предпочтительный вариант осуществления, в котором ДНК встраивают в экспрессирующий вектор, экспрессирующийся в микроорганизме.

Примеры клетки-хозяина, которую можно использовать для получения таких пептидов, как указано выше, включают клетки животных. Примеры клеток животных включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки COS-1, клетки COS-7, клетки VERO (ATCC CCL81), клетки ВНК, клетки MDCK, полученные из почки собаки, клетки хомяка AV-12-664 и т.п. Кроме того, примеры клетки-хозяина, полученной из человека, включают клетки HeLa, клетки WI38, клетки человека 293 и клетки PER.C6. Из этих клеток, клетки CHO являются широко распространенными и предпочтительными, и среди клеток CHO более предпочтительными являются клетки CHO с дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR).

В способе генной инженерии или способе получения пептида часто используют микроорганизмы, такие как *Escherichia coli*. В каждом способе предпочтительно используют систему "хозяин-вектор", и можно выбирать подходящую векторную систему для указанных выше клеток-хозяев. Клонирован ген тромбомодулина, используемый в способе генетической рекомбинации. Описывают примеры получения тромбомодулина с помощью такого способа генетической рекомбинации, и, помимо этого, также известны способы очистки тромбомодулина для получения очищенного продукта (нерассмотренные патентные публикации Японии №№ 64-6219, 2-255699, 5-213998, 5-310787, 7-155176; и *J. Biol. Chem.*, 1989, 264:10351-10353). Таким образом, используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин можно получать с использованием способов, описываемых в указанных выше статьях, или аналогичных способов. Например, в нерассмотренной патентной публикации Японии № 64-6219 описывают штамм *Escherichia coli* K-12 DH5 (регистрационный № в ATCC 67283), содержащий плазмиду pSV2TMJ2, содержащую ДНК, кодирующую полноразмерный тромбомодулин. Этот штамм, хранящийся в бывшем National Institute of Bioscience and Human-Technology (ныне Independent Administrative Institution, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository) (*Escherichia coli* DH5/pSV2TMJ2) (FERM BP-5570), также можно использовать. Используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин можно получать известным способом генной инженерии с использованием ДНК, кодирующей полноразмерный тромбомодулин, в качестве исходного материала.

Тромбомодулин по этому варианту осуществления можно получать общепринятым известным способом или аналогичным способом. Например, можно упомянуть указанный выше способ Yamamoto et al. (нерассмотренная патентная публикация Японии № 64-6219) или способ, описываемый в нерассмотренной патентной публикации Японии № 5-213998. В частности, например, ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, получают из гена тромбомодулина человеческого происхождения способом генной инженерии, и, при необходимости, ее можно дополнительно модифицировать. В случае такой модификации для получения ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 (в частности, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:12), кодоны, кодирующие аминокислоту в положении 473 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 (в частности, нуклеотид в положении 1418 SEQ ID NO:10), подвергают сайт-специфическому мутагенезу способом, описываемым Zoller M.J. et al. (*Method in Enzymology*, 1983, 100:468-500, Academic Press). Например, используя для мутагенеза синтетическую ДНК, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:13,

нуклеотид Т в положении 1418 SEQ ID NO:10 можно преобразовывать в нуклеотид С для получения мутантной ДНК.

ДНК, полученную, как описано выше, встраивают, например, в клетки яичника китайского хомяка (CHO) для получения трансформированных клеток. Такие клетки подвергают соответствующей селекции, и из культурального раствора, получаемого при культивировании выбранной клетки, можно получать тромбомодулин, очищаемый известным способом. Как описано выше, ДНК (SEQ ID NO:10), кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, предпочтительно, трансфицируют в указанную выше клетку-хозяина.

Способ получения тромбомодулина по этому варианту осуществления не ограничен указанным выше способом. Например, также можно экстрагировать и очищать тромбомодулин из мочи, крови, других физиологических жидкостей и т.п. или экстрагировать и очищать тромбомодулин из ткани, продуцирующей тромбомодулин, или культуры указанной выше ткани и т.п. Кроме того, при необходимости, тромбомодулин можно дополнительно подвергать расщеплению с использованием протеазы.

В случае культуры указанной выше трансформированной клетки можно использовать среду, используемую для общепринятых культур клеток, и предпочтительно культивировать трансформированную клетку в различных типах сред для выбора оптимальной среды. Например, в качестве исходной среды можно использовать известную среду, такую как среда MEM, среда DMEM и среда 199, и можно использовать дополнительно улучшенную среду или среду с добавками для различных сред. Примеры способа культивирования включают сывороточную культуру, в которой культивирование осуществляют в среде, содержащей сыворотку крови, и бессывороточную культуру, в которой культивирование осуществляют в среде, не содержащей сыворотку крови. Хотя способ культивирования, в частности, не ограничен, предпочтительной является бессывороточная культура.

В случае сывороточной культуры при добавлении сыворотки в среду, предпочтительной является бычья сыворотка. Примеры бычьей сыворотки включают эмбриональную телячью сыворотку, сыворотку новорожденного теленка, телячью сыворотку, сыворотку взрослого быка и т.п., и любой из этих примеров можно использовать при условии, что сыворотка является подходящей для культуры клеток. В качестве бессывороточной среды, используемой в бессывороточной культуре, можно использовать коммерчески доступные среды. Бессывороточные среды, подходящие для различных клеток, являются коммерчески доступными, и например, в случае клеток CHO среды CD-CHO, CHO-S-SFMII и CHO-III-PFM доступны в Invitrogen, а среды IS CHO, IS CHO-CD и т.п. доступны в Irvine Scientific. Эти среды можно использовать без какой-либо обработки, или их можно улучшать, или включать в них добавки и использовать. Примеры бессывороточных сред дополнительно включают среду DMEM, содержащую по 5 мг/л инсулина, трансферрина и селенистой кислоты. Как описано выше, среда, в частности, не ограничена при условии, что среду можно использовать для получения тромбомодулина по этому варианту осуществления. Способ культивирования в частности, не ограничен, и можно использовать любую из периодической культуры, повторяющейся периодической культуры, подпитываемой культуры, перфузионной культуры и т.п.

Если используемый в этом варианте осуществления тромбомодулин получают указанным выше способом культивирования клеток, можно наблюдать разнообразие N-концевых аминокислот в результате посттрансляционной модификации белка.

Например, N-концевой аминокислотой может служить аминокислота в положении 17, 18, 19 или 22 SEQ ID NO:9. Кроме того, например, N-концевую аминокислоту можно модифицировать таким образом, что глутаминовую кислоту в положении 22 заменяют пироглутаминовой кислотой. Предпочтительно, чтобы в качестве N-концевой

5 аминокислоты служила аминокислота в положении 17 или 19, и более предпочтительно, чтобы в качестве N-концевой аминокислоты служила аминокислота в положении 19. Кроме того, также существует другой вариант осуществления, в котором в качестве N-концевой аминокислоты служит аминокислота в положении 17, являющийся предпочтительным вариантом осуществления. Что касается модификации, разнообразия

10 и т.п., указанных выше, аналогичные примеры можно указывать для последовательности SEQ ID NO:11.

Кроме того, при получении растворимого тромбомодулина с использованием ДНК, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:10, можно наблюдать разнообразие С-концевых аминокислот и можно получать пептид, короче на один

15 аминокислотный остаток. В частности, С-концевую аминокислоту можно модифицировать таким образом, что в качестве С-концевой аминокислоты служит аминокислота в положении 515, а затем положение 515 амидируют. Кроме того, можно получать пептид, короче на два аминокислотных остатка. В частности, в качестве С-концевой аминокислоты может служить аминокислота в положении 514. Таким образом,

20 можно получать любой из пептидов, имеющих значительное разнообразие N-концевых аминокислот и С-концевых аминокислот, или их смесь. Предпочтительно, чтобы в качестве С-концевой аминокислоты служила аминокислота в положении 515 или аминокислота в положении 516, и более предпочтительно, чтобы в качестве С-концевой аминокислоты служила аминокислота в положении 516. Кроме того, также существует

25 другой вариант осуществления, в котором в качестве С-концевой служит аминокислота в положении 514, являющийся предпочтительным вариантом осуществления. Что касается модификации, разнообразия и т.п., описываемого выше, то же самое относится к ДНК, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:12.

Тромбомодулин, получаемый описываемым выше способом, может являться смесью

30 пептидов, имеющих разнообразие N-концевых и С-концевых аминокислот. Конкретные примеры включают смесь пептидов, имеющих последовательности в положениях 19-516, положениях 19-515, положениях 19-514, положениях 17-516, положениях 17-515 и положениях 17-514 SEQ ID NO:9.

Затем можно осуществлять выделение и очистку тромбомодулина из супернатанта

35 культуры или культуры, получаемой, как описано выше, известными способами [издано Takeichi Horio, Tanpakushitsu/Koso no Kiso Jikken Ho (Fundamental Experimental Methods for Proteins and Enzymes), 1981]. Например, предпочтительно использовать ионообменную хроматографию или адсорбционную хроматографию, в которых используют взаимодействие между тромбомодулином и хроматографическим носителем, на котором

40 иммобилизуют функциональные группы, имеющие заряд, противоположный заряду тромбомодулина. Другим предпочтительным примером является аффинная хроматография с учетом конкретной аффинности к тромбомодулину. Предпочтительные примеры адсорбента включают тромбин, являющийся лигандом тромбомодулина, и антитело против тромбомодулина. В качестве антитела можно использовать антитела

45 против тромбомодулина, имеющие подходящие свойства или распознающие соответствующие эпитопы. Примеры включают, например, описываемые в патентной публикации Японии (Kokoku) № 5-42920, нерассмотренных патентных публикациях Японии №№ 64-45398 и 6-205692 и т.п. Другие примеры включают хроматографию с

гель-фильтрацией и ультрафильтрацию, в которых учитывают молекулярный размер тромбомодулина. Другие примеры дополнительно включают гидрофобную хроматографию, в которой используют гидрофобную связь между хроматографическим носителем, на котором иммобилизуют гидрофобные группы, и гидрофобной частью тромбомодулина. Кроме того, при адсорбционной хроматографии в качестве носителя можно использовать гидроксипатит, примеры которого включают, например, описываемые в нерассмотренной патентной публикации Японии № 9-110900. При необходимости эти способы можно использовать в комбинации. Хотя степень очистки можно выбирать в зависимости от цели использования и т.п., желательно очищать тромбомодулин до получения единственной полосы при электрофорезе, предпочтительно, электрофорезе в ПААГ в присутствии SDS, или получения единственного пика при ВЭЖХ с гель-фильтрацией или обращенно-фазовой ВЭЖХ выделенного и очищенного продукта. Конечно, следует понимать, что при использовании двух или более типов тромбомодулинов, предпочтительно, по существу, получать только полосы тромбомодулинов, и нет необходимости в получении единственной полосы.

Конкретные примеры способа очистки, используемого в этом варианте осуществления, включают способ очистки с использованием функций тромбомодулина в качестве критерия, например, способ очистки, включающий грубую очистку супернатанта культуры или продукта культивирования с использованием ионообменной колонки Q-Sepharose Fast Flow для сбора фракции, имеющей функции тромбомодулина; затем очистку фракции на колонке для аффинной хроматографии, колонке с DIP-тромбин-агарозой (диизопропилфосфорилтромбин-агарозой), в качестве основного этапа очистки для выделения фракции, имеющей выраженные функции тромбомодулина; затем концентрирование выделенной фракции с последующей гель-фильтрацией для получения фракции активного тромбомодулина в качестве очищенного продукта (Gomi K. et al., Blood, 1990, 75:1396-1399). Примером функций тромбомодулина, используемых в качестве критерия, является активность стимуляции активации протеина С тромбином. Другие предпочтительные примеры способа очистки будут представлены ниже в качестве примеров.

Выбирают подходящую ионообменную смолу, имеющую хорошие адсорбционные условия для тромбомодулина, и осуществляют очистку посредством ионообменной хроматографии. В частности, предпочтительным примером является способ, включающий использование Q-Sepharose Fast Flow, уравновешенной 0,02 моль/л буфера Tris-HCl (pH 7,4), содержащего 0,18 моль/л NaCl. При необходимости, после промывания можно осуществлять элюирование с использованием 0,02 моль/л буфера Tris-HCl (pH 7,4), содержащего 0,3 моль/л NaCl, например, для получения тромбомодулина в виде грубо очищенного продукта.

Затем, например, для осуществления очистки с помощью аффинной хроматографии на смоле можно иммобилизовывать вещество, имеющее конкретную аффинность к тромбомодулину. Предпочтительные примеры включают колонку с DIP-тромбин-агарозой и колонку с моноклональным антителом против тромбомодулина. В случае колонки с DIP-тромбин-агарозой колонку предварительно уравнивают с использованием 20 ммоль/л буфера Tris-HCl (pH 7,4), содержащего 100 ммоль/л NaCl и 0,5 ммоль/л хлорида кальция, и затем указанный выше грубо очищенный продукт можно загружать на колонку, промывать при необходимости, а затем элюировать с использованием, например, 20 ммоль/л буфера Tris-HCl (pH 7,4), содержащего 1,0 моль/л NaCl и 0,5 ммоль/л хлорида кальция, для получения тромбомодулина в виде очищенного

продукта. В случае колонки с моноклональным антителом против тромбомодулина пример способа включает: приведение раствора моноклонального антитела против тромбомодулина в буфере 0,1 моль/л NaHCO_3 (pH 8,3), содержащем 0,5 моль/л NaCl , в контакт с Sepharose 4FF (GE Health Care Biosciences), предварительно активированной с помощью CNBr для получения смолы Sepharose 4FF, соединенной с моноклональными антителами против тромбомодулина, уравнивания смолы, которой предварительно наполняют колонку, с использованием, например, 20 ммоль/л фосфатного буфера (pH 7,3), содержащего 0,3 моль/л NaCl , при необходимости, промывание смолы, а затем осуществление элюирования с использованием 100 ммоль/л буфера глицин-HCl (pH 3,0), содержащего 0,3 моль/л NaCl . Элюат можно нейтрализовывать подходящим буфером для получения продукта в виде очищенного продукта.

Впоследствии, очищенный продукт доводят до pH 3,5, а затем нагружают им катионный обменник, предпочтительно SP-Sepharose FF (GE Health Care Biosciences) в качестве сильного катионного обменника, уравновешенного с использованием 100 ммоль/л буфера глицин-HCl (pH 3,5), содержащего 0,3 моль/л NaCl , и осуществляют промывание тем же буфером для получения неадсорбированной фракции. Полученную фракцию нейтрализуют подходящим буфером для получения высокоочищенного продукта. Предпочтительно, эти продукты концентрируют ультрафильтрацией.

Кроме того, также предпочтительно заменять буфер с помощью гель-фильтрации. Например, высокоочищенный продукт, концентрированный с помощью ультрафильтрации, можно загружать на колонку Sephacryl S-300 или колонку S-200, уравниваемую с использованием 20 ммоль/л фосфатного буфера (pH 7,3), содержащего 50 ммоль/л NaCl , и затем дать подняться растворителю для фракционирования с использованием 20 ммоль/л фосфатного буфера (pH 7,3), содержащего 50 ммоль/л NaCl . Для сбора активной фракции и, таким образом, получения высокоочищенного продукта с замененным буфером можно подтверждать активность стимуляции активации протеина С тромбином. Для повышения безопасности высокоочищенный продукт, полученный, как описано выше, предпочтительно, фильтруют через подходящий фильтр для элиминации вирусов, таких как Planova 15N (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), а затем полученный продукт можно концентрировать с помощью ультрафильтрации до желаемой концентрации. Наконец, продукт, предпочтительно, фильтруют через фильтр для асептической фильтрации.

Термин "химиотерапия злокачественного новообразования", относящийся к этому варианту осуществления, означает способ лечения злокачественного новообразования с использованием противоракового средства.

Термин "противораковое средство", относящийся к этому варианту осуществления, в частности, не ограничен при условии, что оно является лекарственным средством, имеющим противораковую активность, вызывающим симптомы периферической нейропатической боли в качестве побочных реакций при его введении пациенту.

Примеры включают, например, противораковые средства, ингибирующие метаболизм нуклеиновых кислот (препараты платины и т.п.), противораковые средства, ингибирующие полимеризацию микротрубочек (средства на основе алкалоида барвинка), противораковые средства, ингибирующие деполимеризацию микротрубочек (таксановые средства), противораковые средства, демонстрирующие антагонистическое действие по отношению к гормонам (средства против эстрогена т.п.), противораковые средства, ингибирующие внутриклеточную передачу сигнала (ингибиторы протеасом и т.п.), противораковые средства, действующие на молекулярную мишень, специфичную для злокачественной опухоли (ингибиторы тирозинкиназ, препараты антител и т.п.), и

противораковые средства, демонстрирующие действие в отношении неспецифической активации иммунной системы (препараты гемолитического стрептококка и т.п.), и предпочтительными являются противораковые средства, ингибирующие метаболизм нуклеиновых кислоты, и противораковые средства ингибирующие полимеризацию или деполимеризацию микротрубочек. Например, противораковое средство включает один или несколько типов противораковых средств, выбранных из группы, состоящей из таксановых средств и препаратов платины, и предпочтительным является таксановое средство или препарат платины, и более предпочтительным является таксановое средство. В другом варианте осуществления предпочтительным может являться препарат платины.

Примеры таксановых средств включают паклитаксел, доцетаксел, тамоксифен и т.п. Предпочтительными являются один или несколько типов, выбранных из группы, состоящей из паклитаксела и доцетаксела, и более предпочтительным является паклитаксел.

Примеры препаратов платины включают оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, недаплатин и т.п. Предпочтительными являются один или несколько типов препаратов, выбранных из группы, состоящей из оксалиплатина, цисплатина, карбоплатина и недаплатина, и более предпочтительным является оксалиплатин.

Периферическая нейропатическая боль, вызываемая противораковым средством, являющаяся предметом профилактического и/или терапевтического лечения с использованием лекарственного средства по этому варианту осуществления, включает, по меньшей мере, периферическую нейропатическую боль, вызываемую терапией единственным лекарственным средством с использованием одного типа противоракового средства, а также включает периферическую нейропатическую боль, вызываемую терапией несколькими лекарственными средствами с использованием двух или более типов лекарственных средств в комбинации с учетом различных типов их действия. Примеры терапии несколькими лекарственными средствами включают, например, терапию FOLFOX, терапию FOLFIRI и т.п., но терапия не ограничена этими примерами. В качестве объекта применения лекарственного средства по этому варианту осуществления предпочтительной является, например, периферическая нейропатическая боль, вызываемая терапией FOLFOX. В другом варианте осуществления предпочтительной может являться периферическая нейропатическая боль, вызываемая терапией FOLFIRI.

Терапия FOLFOX является одним из классов химиотерапии злокачественных новообразований, в которой в комбинации используют оксалиплатин, фторурацил и левофолинат. В зависимости от способа введения терапию FOLFOX классифицируют, например, на FOLFOX2, FOLFOX3, FOLFOX4, FOLFOX6, mFOLFOX6, FOLFOX7, mFOLFOX7 и т.п.

Терапия FOLFIRI является одним из классов химиотерапии злокачественных новообразований, в которой в комбинации используют иринотекан, фторурацил, левофолинат и лейковорин.

Примеры противораковых средств, ингибирующих метаболизм нуклеиновых кислот включают, например, алкилирующие средства (например, циклофосфамид и нимустин), противоопухолевые антибиотики (например, доксорубин, митомицин С и блеомицин), ингибиторы топоизомераз (например, иринотекан и этопозид), препараты платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), ингибиторы метаболизма пиримидина (например, меркаптопурин и флударабин) и ингибиторы синтеза фолиевой кислоты (например, метотрексат). Среди них предпочтительными являются препараты

платины, и более предпочтительным является оксалиплатин, т.к. он является противораковым средством, наиболее часто вызывающим периферическую нейропатическую боль, и крайне желательным является способ лечения такой периферической нейропатической боли.

5 Примеры противораковых средств, ингибирующих полимеризацию или деполимеризацию микротрубочек, включают средства на основе алкалоида барвинка (например, винкристин и винбластин), таксановые средства (например, паклитаксел, доцетаксел и тамоксифен) и антиандрогенные средства (например, флутамид). Среди них предпочтительными являются таксановые средства, и наиболее предпочтительным
10 является паклитаксел.

Примеры противораковых средств, имеющих антагонистическое действие в отношении гормонов, включают, например, противоэстрогеновые средства (например, тамоксифен) и антиандрогенные средства (например, флутамид).

15 Примеры противораковых средств, ингибирующих внутриклеточную передачу сигнала, включают, например, ингибиторы протеасом (например, бортезомиб).

Примеры противораковых средств, действующих на молекулярную мишень, специфичную для злокачественной опухоли, включают, например, ингибиторы тирозинкиназ BCR/ABL (например, иматиниб), ингибиторы тирозинкиназ EGFR (например, gefitinib), препараты антител (например, ритуксимаб, трастузумаб и
20 тоцилизумаб) и препараты мышьяка.

Примеры противораковых средств, имеющих действие в отношении неспецифической активации иммунной системы, включают, например, препараты гемолитического стрептококка и препараты полисахарида Coriolus.

Термин "периферическая нейропатическая боль, вызываемая противораковым
25 средством", относящийся к этому варианту осуществления, означает периферическую нейропатическую боль, возникающую в результате введения такого противоракового средства, примеры которого приведены выше. Ее также можно обозначать как "индуцируемая химиотерапией периферическая нейропатическая боль". Примеры симптомов периферической нейропатической боли включают онемение конечностей,
30 боль в конечностях, снижение глубоких рефлексов сухожилий, снижение мышечной силы, аллодинию, гипералгезию и двигательную дисфункцию. Примеры симптомов периферической нейропатической боли также включают боли, такие как интенсивная боль и жгучая боль, онемение дистальных отделов конечностей, аномальные ощущения, такие как ощущение жжения, гиперестезию, такую как холодовая гиперчувствительность,
35 дизестезию, такую как анестезию, сенсорный паралич и дискомфорт, сенсорную атаксию и снижение мышечной силы. Аллодиния, как правило, означает симптом восприятия стимула, который, как правило, не вызывает боль (например, легкого касания и надавливания или стимула слегка пониженной температуры), в качестве боли. Аллодиния, вызываемая противораковым средством, включает острую аллодинию,
40 возникающую непосредственно после введения противоракового средства, и хроническую аллодинию, возникающую с задержкой при продолжении лечения противораковым средством, и эти типы аллодинии также включены в объем периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, относящейся к этому варианту осуществления. Острая аллодиния является характерной
45 для оксалиплатина. В качестве диагностических критериев аллодинии вызываемой противораковым средством, используют DEB-NTC (Neurotoxicity Criteria of Debiopharm), CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) и т.п.

В этом варианте осуществления аллодиния как периферическая нейропатическая

боль, в частности, не ограничена при условии, что она является симптомом восприятия в качестве боли стимула, который, как правило, не вызывает боль. Примеры включают, например, механическую аллодинию и холодовую аллодинию, и предпочтительным примером является механическая аллодиния. В другом варианте осуществления

5 предпочтительной может являться холодовая аллодиния.

Примеры механической аллодинии включают симптом восприятия в качестве боли стимула прикосновения, который, как правило, не вызывает боль. Примеры включают, например, симптомы затруднений в повседневной деятельности, такой как застегивание пуговиц рубашки, вынимание монет из кошелька и ходьба.

10 Примеры холодовой аллодинии включают симптом восприятия в качестве боли холодового стимула, который, как правило, не вызывает боль. Примеры включают, например, симптомы затруднений в такой повседневной деятельности, как приготовление пищи и мытье с использованием воды, удержание стакана, содержащего воду, и выход на улицу в зимний сезон.

15 В этом варианте осуществления тромбомодулин можно вводить перед введением противоракового средства (профилактическое введение) или его можно вводить после введения противоракового средства (терапевтическое введение). Предпочтительно вводить его после введения противоракового средства. В другом варианте осуществления предпочтительным может являться его введение перед введением

20 противоракового средства. Кроме того, тромбомодулин и противораковое средство также можно вводить одновременно. Как показано в приведенных ниже тестовых примерах 1, введение тромбомодулина сразу после введения противоракового средства или введение тромбомодулина одновременно с введением противоракового средства является одним из предпочтительных вариантов осуществления профилактического

25 введения.

Кроме того, и при профилактическом введении, и при терапевтическом введении тромбомодулин можно вводить в период введения противоракового средства.

С точки зрения непрерывности эффекта предпочтительным является профилактическое введение. Другими словами, лекарственное средство по этому

30 варианту осуществления предпочтительно является лекарственным средством для профилактического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством.

При введении тромбомодулина перед введением противоракового средства время с момента введения тромбомодулина до момента введения противоракового средства,

35 в частности, не ограничено при условии, что может проявляться эффект профилактики периферической нейропатической боли. Предпочтительно, тромбомодулин вводят за 9 дней, более предпочтительно - за 7 дней, еще более предпочтительно - за 5 дней, более предпочтительно - за 3 дня, наиболее предпочтительно - за 1 день до введения противоракового средства или впоследствии. В другом варианте осуществления наиболее

40 предпочтительно вводить тромбомодулин за 12 часов до введения противоракового средства или после него. Например, тромбомодулин и стероид для профилактики анафилактического шока можно вводить одновременно или отдельно перед введением противоракового средства. Кроме того, тромбомодулин можно вводить одновременно, до или после введения антиэметика, противоаллергического средства и/или

45 противовоспалительного средства, которые, как правило, вводят непосредственно перед внутривенным введением противоракового средства посредством капельной инфузии.

При введении тромбомодулина после введения противоракового средства, время с

момента введения противоракового средства до момента введения тромбомодулина, в частности, не ограничено при условии, что может проявляться эффект терапевтического лечения периферической нейропатической боли. Предпочтительно, тромбомодулин вводят через 8 дней, более предпочтительно - через 6 дней, еще более предпочтительно - через 4 дня, особенно предпочтительно - через 2 дня, наиболее предпочтительно - через 6 часов после введения противоракового средства или до него. В другом варианте осуществления наиболее предпочтительным является введение тромбомодулина через 1 час после введения противоракового средства или до него.

Лекарственное средство по этому варианту осуществления может содержать носитель.

В качестве носителя, примененного в настоящем изобретении, предпочтительным является водорастворимый носитель, и, например, лекарственное средство по настоящему изобретению можно получать, добавляя сахарозу, глицерин, модификатор рН, состоящий из неорганической соли, или т.п., в качестве добавок. Кроме того, при необходимости, можно добавлять аминокислоты, соли, углеводы, поверхностно-активные вещества, альбумин, желатин или т.п., как описывают в нерассмотренных патентных публикациях Японии №№ (Hei)1-6219 и (Hei)6-321805, а также предпочтительно добавлять консервант. Предпочтительные примеры консерванта включают сложные эфиры парабензойной кислоты, и особенно предпочтительным примером является метилпарабензоат. Количество консерванта для добавления, как правило, составляет от 0,01 до 1,0% (в терминах % масс., то же самое относится к следующим описаниям), предпочтительно - от 0,1 до 0,3%. Способ добавления этих добавок, в частности, не ограничен. В случае получения лиофилизированного продукта примеры способа включают, например, способ смешивания раствора, содержащего противораковое средство, и раствора, содержащего тромбомодулин, а затем добавления добавок в смесь, и способ смешивания добавок с противораковым средством, предварительно растворенным в воде, воде для инъекций или подходящем буфере, добавления в смесь раствора, содержащего тромбомодулин, смешивания полученной смеси для получения раствора и лиофилизацию раствора общепринятыми способами. Если лекарственное средство по настоящему изобретению является лекарственным средством, содержащим комбинацию компонентов лекарственного средства, предпочтительно, каждый компонент получают добавлением носителя в соответствии с подходящим способом получения. Лекарственное средство по этому варианту осуществления можно предоставлять в инъекционной форме или в форме лиофилизированного препарата, подлежащего растворению при использовании.

Примеры способа получения лекарственного средства включают способ наполнения раствором, содержащим от 0,05 до 15 мг/мл, предпочтительно - от 0,1 до 5 мг/мл тромбомодулина и указанные выше добавки в воде для инъекций или подходящем буфере, ампулы или сосуда объемом, например, от 0,5 до 10 мл, замораживания раствора и высушивания раствора при пониженном давлении. Такой раствор, по существу, можно получать в виде препарата водного раствора для инъекций.

Лекарственное средство по настоящему изобретению желательно вводить посредством парентерального введения, такого как внутривенное введение, внутримышечное введение и подкожное введение. Лекарственное средство также можно вводить посредством перорального введения, интаректального введения, интраназального введения, сублингвального введения или т.п. Если лекарственное средство по настоящему изобретению является лекарственным средством, содержащим комбинацию множества активных ингредиентов, каждый активный ингредиент лекарственного средства, предпочтительно, вводят способом введения, подходящим

для ингредиента.

Примеры способа внутривенного введения включают способ введения желаемой дозы лекарственного средства единовременно и внутривенное введение посредством капельной инфузии.

5 Способ единовременного введения желаемой дозы лекарственного средства (внутривенного болюсного введения) является предпочтительным с точки зрения того, что для способа необходимо лишь короткое время введения. При единовременном введении лекарственного средства период, необходимый для введения с использованием инъекционного шприца, как правило, может варьироваться. В основном, период времени, 10 необходимый для введения, составляет, например, 5 минут или менее, предпочтительно - 3 минуты или менее, более предпочтительно - 2 минуты или менее, еще более предпочтительно - 1 минуту или менее, особенно предпочтительно - 30 секунд или менее, хотя он зависит от объема, подлежащего введению. Хотя минимальное время введения, в частности, не ограничено, период времени предпочтительно составляет 1 15 секунду или более, более предпочтительно - 5 секунд или более, еще более предпочтительно - 10 секунд или более. Доза, в частности, не ограничена при условии, что доза находится в диапазоне указанной выше предпочтительной дозы. Внутривенное введение посредством капельной инфузии также является предпочтительным с точки зрения того, что уровень тромбомодулина в крови можно легко сохранять постоянным.

20 Суточная доза лекарственного средства по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от возраста, массы тела пациентов, тяжести заболевания, способа введения и т.п. В основном, максимальная доза, предпочтительно, составляет 20 мг/кг или менее, более предпочтительно - 10 мг/кг или менее, еще более предпочтительно - 5 мг/кг или менее, особенно предпочтительно - 2 мг/кг или менее, и 25 наиболее предпочтительно - 1 мг/кг или менее, и минимальная доза, предпочтительно, составляет 0,001 мг/кг или более, более предпочтительно - 0,005 мг/кг или более, еще более предпочтительно - 0,01 мг/кг или более, особенно предпочтительно - 0,02 мг/кг или более, и наиболее предпочтительно - 0,05 мг/кг или более в терминах количества тромбомодулина.

30 Хотя доза, в частности, не ограничена при условии, что доза находится в диапазоне указанной выше предпочтительной дозы, в случае внутривенного болюсного введения максимальная суточная доза, предпочтительно, составляет 1 мг/кг или менее, более предпочтительно - 0,5 мг/кг или менее, еще более предпочтительно - 0,1 мг/кг или менее, особенно предпочтительно - 0,08 мг/кг или менее, и наиболее предпочтительно - 0,06 35 мг/кг или менее, и минимальная доза, предпочтительно, составляет 0,005 мг/кг или более, более предпочтительно - 0,01 мг/кг или более, еще более предпочтительно - 0,02 мг/кг или более, и особенно предпочтительно - 0,04 мг/кг или более.

Если лекарственное средство по настоящему изобретению вводят пациенту, имеющему массу тела, превышающую 100 кг, предпочтительным может являться введение 40 фиксированной дозы 6 мг, т.к. объем крови не пропорционален массе тела, и у такого пациента объем крови относительно снижен по отношению к массе тела.

Хотя доза, в частности, не ограничена при условии, что доза находится в диапазоне указанной выше предпочтительной дозы, в случае непрерывной внутривенной инфузии максимальная суточная доза, предпочтительно, составляет 1 мг/кг или менее, более 45 предпочтительно - 0,5 мг/кг или менее, еще более предпочтительно - 0,1 мг/кг или менее, особенно предпочтительно - 0,08 мг/кг или менее, и наиболее предпочтительно - 0,06 мг/кг или менее, и минимальная доза, предпочтительно, составляет 0,005 мг/кг или более, более предпочтительно - 0,01 мг/кг или более, еще более предпочтительно - 0,02

мг/кг или более, и особенно предпочтительно - 0,04 мг/кг или более.

Лекарственное средство по этому варианту осуществления, в частности, не ограничено при условии, что можно подтверждать эффект профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, после введения тромбомодулина, и эффект подтверждают в течение, например, 24 часов, предпочтительно - 12 часов, более предпочтительно - 6 часов, еще более предпочтительно - 3 часов, особенно предпочтительно - 1 часа, наиболее предпочтительно - 30 минут после введения тромбомодулина. Как описано выше, лекарственное средство по этому варианту осуществления иногда может отличаться тем, что эффект профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, можно подтверждать на ранней стадии.

Лекарственное средство по этому варианту осуществления можно прописывать как препарат для периодического введения или препарат для непрерывного введения, и предпочтительно прописывать его как препарат для периодического введения.

Периодическое введение означает введение или высвобождение лекарственного средства на организме или внутри организма один или более раз, предпочтительно - два или более раз, с конкретным интервалом прерывистым образом. Например, периодическое введение можно осуществлять посредством введения один или два раза в сутки, и предпочтительным является введение один раз в сутки. Кроме того, периодическое введение можно осуществлять посредством ежедневного введения или введения 1-3 дня в неделю, или введения 1-5 дней в неделю, и предпочтительным является введение 1 день в неделю. В другом варианте осуществления предпочтительным может являться введение 5 дней в неделю. В другом варианте осуществления предпочтительным может являться ежедневное введение.

Кроме того, периодическое введение можно осуществлять посредством введения один раз в сутки, один раз в неделю, 3 раза в неделю, 5 раз в неделю или один раз в две недели, и предпочтительным является введение один раз в неделю. В другом варианте осуществления предпочтительным может являться введение 5 раз в неделю. В другом варианте осуществления предпочтительным может являться ежедневное введение. Кроме того, в зависимости от обстоятельств предпочтительным может являться введение один раз в две недели.

Непрерывное введение означает способ введения, при котором лекарственное средство непрерывно высвобождается в организме в течение конкретного периода времени, например, по меньшей мере 5 минут или более. Способ введения не ограничен при условии, что его осуществляют посредством системного введения или местного введения в периферическую ткань. Примеры введения или способов введения включают введение с использованием инструментов, таких как инфузионный насос или трансфузионный насос, введение вручную, введение препаратов с замедленным высвобождением, в которых в качестве носителя используют полимер, деградирующий в живых организмах, и т.п.

Пациент, подвергаемый введению лекарственного средства по этому варианту осуществления, в частности, не ограничен при условии, что пациенту вводят противораковое средство, и конкретные примеры включают пациентов со злокачественными новообразованиями. Примеры пациентов со злокачественными новообразованиями включают пациентов, страдающих одним или несколькими типами злокачественных новообразований, выбранных из группы, состоящей, например, из рака яичников, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака желудка,

рака эндометрия, рака головы и шеи, карциномы пищевода, лейкоза, злокачественной лимфомы, опухоли детского возраста, множественной миеломы, злокачественной астроцитомы, нейроглиомы, трофобластической опухоли, герминогенной опухоли, рака легких, опухоли яичка, рака мочевого пузыря, опухоли почечной лоханки, опухоли мочеиспускательного канала, рака предстательной железы, карциномы шейки матки, нейробластомы, мелкоклеточного рака легких, остеосаркомы, злокачественной мезотелиомы плевры, злокачественной остеомы и рака толстого кишечника.

Лекарственное средство по этому варианту осуществления можно вводить совместно с одним или несколькими типами других лекарственных средств, используемых для лечения периферических нейропатий, вызываемых противораковыми средствами, например, одним, или двумя или более типами лекарственных средств, выбранных из стероидов, антидепрессантов, антиконвульсантов, опиоидов и т.п., или его можно получать в виде смеси с таким одним или двумя или более типами лекарственных средств, как указано выше, и вводить. Кроме того, тромбомодулин можно вводить с проведением физиотерапии, вспомогательных способов терапии, таких как массаж и акупунктура, и т.п.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, вводимому вместе с противораковым средством и содержащему тромбомодулин в качестве активного ингредиента. Примеры тромбомодулина, используемого в этом варианте осуществления, включают указанные выше предпочтительные примеры растворимого тромбомодулина. Кроме того, примеры противоракового средства, используемого в этом варианте осуществления, включают указанные выше предпочтительные примеры противоракового средства. Кроме того, примеры периферической нейропатической боли, относящиеся к этому варианту осуществления, включают указанные выше предпочтительные примеры периферической нейропатической боли.

Настоящее изобретение дополнительно относится к лекарственному средству для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, содержащему тромбомодулин и противораковое средство в качестве активных ингредиентов.

Кроме того, в объем настоящего изобретения также входит способ профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, включающий этап введения тромбомодулина млекопитающему.

Кроме того, в объем настоящего изобретения также входит применение тромбомодулина для производства лекарственного средства для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение далее будет подробно описано со ссылкой на тестовые примеры и примеры. Однако настоящее изобретение несколько не ограничено этими примерами.

Описание списка последовательностей

SEQ ID NO:1: Аминокислотная последовательность, кодируемая геном, используемая в получении TME456

SEQ ID NO:2: Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1

SEQ ID NO:3: Аминокислотная последовательность, кодируемая геном, используемая в получении TME456M

SEQ ID NO:4: Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3

5 SEQ ID NO:5: Аминокислотная последовательность, кодируемая геном, используемая в получении TMD12

SEQ ID NO:6: Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5

10 SEQ ID NO:7: Аминокислотная последовательность, кодируемая геном, используемая в получении TMD12M

SEQ ID NO:8: Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7

SEQ ID NO:9: Аминокислотная последовательность, кодируемая геном, используемая в получении TMD123

15 SEQ ID NO:10: Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9

SEQ ID NO:11: Аминокислотная последовательность, кодируемая геном, используемая в получении TMD123M

20 SEQ ID NO:12: Нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11

SEQ ID NO:13: Синтетическая ДНК для мутации, используемая для осуществления сайт-специфического мутагенеза

Тромбомодулин по настоящему изобретению, используемый в тестовых примерах, получали указанным выше способом Yamamoto et al. (способом, описываемым в
25 нерассмотренной патентной публикации Японии № 64-6219). Примеры его получения описывают ниже. Безопасность тромбомодулинов, полученных в этих примерах получения, подтверждали тестами с однократным и повторным внутривенным введением с использованием крыс и обезьян, тестом на репродуктивную способность мышей, тестом на местное раздражение, тестом на фармакологическую безопасность, тестом
30 на инактивацию вирусов и т.п.

Пример получения 1

Получение тромбомодулина

Высокоочищенный продукт получали указанным выше способом. В частности, клетки яичника китайского хомяка (CHO) трансфицировали с использованием ДНК,
35 кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 (в частности, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:10). Высокоочищенный продукт получали из культуры указанных выше трансформированных клеток, собирая активную фракцию с использованием 20 ммоль/л фосфатного буфера (pH 7,3), содержащего 50 ммоль/л NaCl, указанным выше общепринятым способом очистки. Затем продукт
40 концентрировали посредством ультрафильтрации для получения раствора тромбомодулина, имеющего концентрацию 11,2 мг/мл (далее сокращенно обозначаемого в настоящем описании как TMD123).

Получение раствора добавки

Гидрохлорид аргинина (480 г, Ajinomoto) взвешивали, помещали в сосуд из
45 нержавеющей стали емкостью 10 л, добавляли воду для инъекций (5 л) и растворяли. Раствор доводили до pH 7,3, добавляя раствор 1 моль/л гидроксида натрия.

Получение и наполнение раствора лекарственного средства

Общий объем раствора добавки, полученного, как указано выше, помещали в сосуд

из нержавеющей стали емкостью 20 л и добавляли раствор TMD123, полученный, как указано выше (2398 мл, соответствующие 26,88 г растворимого белка тромбомодулина, добавленные с избытком 12%), и смесь перемешивали. Затем в смесь добавляли воду для инъекций для получения общего объема 12 л, и смесь делали однородной

5 посредством перемешивания. Этот раствор лекарственного средства подвергали стерилизующей фильтрации с использованием фильтра, имеющего диаметр пор 0,22 мкм (MCGL10S, производимого Millipore). Фильтратом наполняли сосуды в объеме 1 мл каждый, и сосуды наполовину закрывали резиновыми пробками.

Лиофилизация

10 Этап лиофилизации осуществляли в следующих условиях в порядке лиофилизация → наполнение азотом → полное закрытие резиновой пробкой → завинчивание крышки для получения препарата, содержащего TMD123, содержащего 2 мг растворимого тромбомодулина и 40 мг гидрохлорида аргинина в одном сосуде.

Условия лиофилизации

15 Предварительное охлаждение (от комнатной температуры до 15°C за 15 минут) → основное охлаждение (с 15°C до -45°C за 2 часа) → удержание (-45°C в течение 2 часов) → начало вакуумирования (-45°C в течение 18 часов) → повышение температуры (с -45°C до 25°C за 20 часов) → удержание (25°C в течение 15 часов) → повышение температуры (с 25°C до 45°C за 1 час) → удержание (45°C в течение 5 часов) → доведение

20 до комнатной температуры (с 45°C до 25°C за 2 часа) → восстановление давления и наполнение азотом (до -100 мм рт.ст.) → полное закрытие пробкой → завинчивание крышки.

Пример получения 2

Клетки яичника китайского хомяка (CHO) трансфицировали с использованием ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 (в частности,

25 состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:12), получали раствор тромбомодулина, выделенного из культуры указанных выше трансформированных клеток (далее также сокращенно обозначаемого в настоящем описании как TMD123M), указанным выше общепринятым способом очистки и получали лиофилизированный

30 препарат TMD123M аналогично описываемому выше.

Пример получения 3

Клетки яичника китайского хомяка (CHO) трансфицировали с использованием ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 (в частности, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2), получали тромбомодулин,

35 выделенный из культуры указанных выше трансформированных клеток (далее также сокращенно обозначаемый в настоящем описании как TME456), указанным выше общепринятым способом очистки и получали лиофилизированный препарат TME456 аналогично описываемому выше.

Пример получения 4

40 Клетки яичника китайского хомяка (CHO) трансфицировали с использованием ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 (в частности, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:4), получали тромбомодулин, выделенный из культуры указанных выше трансформированных клеток (далее также сокращенно обозначаемый в настоящем описании как TME456M), указанным выше

45 общепринятым способом очистки и получали лиофилизированный препарат TME456M аналогично описываемому выше.

Пример получения 5

Клетки яичника китайского хомяка (CHO) трансфицировали с использованием ДНК,

кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 (в частности, состоящей из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6), получали тромбомодулин, выделенный из культуры указанных выше трансформированных клеток (далее также сокращенно обозначаемый в настоящем описании как TMD12), указанным выше
 5 общепринятым способом очистки и получали лиофилизированный препарат TMD12 аналогично описываемому выше.

Пример получения 6

Клетки яичника китайского хомяка (СНО) трансфицировали с использованием ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 (в частности, состоящей
 10 из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:8), получали тромбомодулин, выделенный из культуры указанных выше трансформированных клеток (далее также сокращенно обозначаемый в настоящем описании как TMD12M), указанным выше общепринятым способом очистки и получали лиофилизированный препарат TMD12M аналогично описываемому выше.

Тестовый пример 1

Действие на аллодинию у мышей, индуцируемую паклитакселом

Для подтверждения эффекта тромбомодулина в отношении аллодинии, вызываемой противораковым средством, исследовали действие тромбомодулина на аллодинию, вызываемую механическим стимулом, генерируемым при введении мыши
 20 противоракового средства паклитаксел. В качестве тестового лекарственного средства мышам интраперитонеально вводили TMD123 и осуществляли следующий тест.

(1) Получение модели аллодинии у мышей, индуцируемой введением паклитаксела

В качестве экспериментальных животных использовали самцов мышей ddY возрастом 4-5 недель (от 20 до 30 г) и вводили им интраперитонеально 4 мг/кг паклитаксела (далее
 25 также сокращенно обозначаемого как РТХ). Введение осуществляли всего 4 раза через день (дни 0, 2, 4 и 6). Мышам контрольной группы аналогично вводили 0,5 мл растворителя для РТХ, т.е. смешанный раствор 1:1 Cremophor EL и этанола, разбавленный до 1,5 мл физиологическим раствором.

В качестве паклитаксела использовали паклитаксел (100 мг, LKT Laboratories, Inc.).

(2) Введение тестового лекарственного средства

В эксперименте по оценке профилактического эффекта экспериментальных животных делили на 5 групп, т.е. контрольную группу, группу введения РТХ и группы введения РТХ и 0,1, 1 или 10 мг/кг тромбомодулина (группы введения РТХ+ТМ). В эксперименте по оценке терапевтического эффекта экспериментальных животных делили на две
 35 группы, т.е. группу введения РТХ и группу введения РТХ и 10 мг/кг тромбомодулина (группу введения РТХ+ТМ). В эксперименте по профилактическому лечению TMD123, представляющий собой тромбомодулин, вводили интраперитонеально мышам из группы введения РТХ+ТМ один раз в сутки в течение 7 дней со дня начала введения РТХ. Кроме того, в эксперименте по терапевтическому лечению TMD123 вводили
 40 интраперитонеально один раз через 8 или 9 дней после окончания введения РТХ. Мышам из контрольной группы и группы введения РТХ аналогично вводили растворитель для TMD123.

(3) Статистический анализ

Статистический анализ результатов осуществляли с использованием теста Вилкоксона для сравнения двух групп, Н-критерия Краскела-Уоллиса и теста LSD-типа (наименьшая
 45 значимая разность) для сравнения трех или более групп и определяли критическое значение 5% или менее для определения наличия значимого различия.

Значения символов, используемых на графиках, являлись следующими.

*, ** и ***: Сравнение измеряемых значений для контрольной группы и группы введения РТХ, символы представляют собой $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно. † и †††: Сравнение измеряемых значений для группы введения РТХ и группы введения РТХ и тестового лекарственного средства, символы представляют собой $p < 0,05$ и $p < 0,001$, соответственно.

(4) Тест фон Фрея

Пороговые значения боли у указанных выше мышей измеряли способом "вверх-вниз" с использованием нити фон Фрея. А именно, использовали нити фон Фрея силой 0,008, 0,02, 0,04, 0,07, 0,16, 0,4, 0,6 и 1,0 г для непрерывной стимуляции ступней задних конечностей мышей в течение 6 секунд и наблюдали реакции мышей, такие как подъем, дрожь и вылизывание стимулированных конечностей. Стимуляцию начинали с меньшей силой и, когда не наблюдали какой-либо реакции, осуществляли стимуляцию с силой, большей на одну ступень. При наблюдении реакции осуществляли стимуляцию с силой, меньшей на одну ступень, через интервал 30 секунд или более. Стимуляцию повторяли 5 раз с первой реакции после начала стимуляции, и в качестве порогового значения боли определяли силу нити, при которой 50% мышей демонстрировали реакции.

Базовое пороговое значение измеряли до введения РТХ, а затем измеряли пороговое значение боли в день введения РТХ и день 8 или 9 после начала введения для последующего наблюдения. В эксперименте по терапевтическому лечению в день 8 или впоследствии подтверждали достаточное снижение порогового значения боли, а затем осуществляли измерение.

Что касается результатов указанного выше теста (способа "вверх-вниз" с использованием нитей фон Фрея), результаты профилактического введения TMD123 представлены на фиг.1, а результаты терапевтического введения TMD123 представлены на фиг.2. Пороговое значение боли (порог) значительно снижалось в группе введения РТХ по сравнению с контрольной группой, в то время как такое снижение порогового значения, наблюдаемое в группе введения РТХ, значительно подавлялось в группе профилактического введения РТХ+ТМ. Кроме того, в группе терапевтического введения РТХ+ТМ пороговое значение, снижаемое при введении РТХ, значительно повышалось с 30 минут после введения и поддерживалось в течение 3 часов или более после введения.

С учетом указанных выше результатов выявили, что тромбомодулин оказывает профилактический и/или терапевтический эффект в отношении механической аллодинии, индуцируемой РТХ, с лучшим быстроедействием и долговременностью.

Тестовый пример 2

Тест холодовой стимуляции 1 (тест с холодной пластиной)

Наблюдая аллодинию, индуцируемую холодовой стимуляцией приведенным ниже способом, можно подтверждать эффект настоящего изобретения в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством.

(1) Получение модели аллодинии у крыс, индуцируемой введением паклитаксела

В качестве экспериментальных животных использовали самцов крыс SD возрастом 5 недель (от 150 до 200 г) и интраперитонеально вводили им 4 мг/кг РТХ. Введение осуществляли всего 4 раза через день (дни 0, 2, 4 и 6). Крысам из контрольной группы аналогично вводили 0,5 мл растворителя для РТХ, т.е. смешанный раствор 1:1 Cremophor EL и этанола, разбавленный до 1,5 мл физиологическим раствором.

(2) Введение тестового лекарственного средства

Экспериментальных животных делили на три группы, т.е. контрольную группу, группу введения РТХ и группу введения РТХ и тромбомодулина (группа введения РТХ+ТМ). Крысам из группы введения РТХ+ТМ интраперитонеально вводили TMD123,

представляющий собой тромбомодулин, один раз в сутки в течение 7 дней (10 мг/кг) со дня начала введения РТХ в качестве профилактического введения и однократно интраперитонеально вводили (10 мг/кг) на следующий день после последнего введения РТХ в качестве терапевтического введения. Крысам из контрольной группы и группы введения РТХ аналогично вводили растворитель для TMD123.

(3) Тест с холодной пластиной

Можно подтверждать эффект настоящего изобретения в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, измеряя латентные периоды для действий по уклонению после стимулов, даваемых 5 раз поочередно на ступни правой и левой задних конечностей крыс из указанных выше 5 групп с использованием прикосновения части для холодной стимуляции устройства для анализа порогового значения ощущения холода, контролируемого на уровне 8°C, для наблюдения аллодинии, индуцируемой холодной стимуляцией. Расчетное время составляло, например, 15 секунд. Измерение можно осуществлять за 5 часов до введения РТХ, через 1 час после введения РТХ, через 2, 3, 5, 7, 9 и 11 дней после введения РТХ, через 15 дней после введения РТХ и до введения тестового лекарственного средства, через 15 дней после введения РТХ и через 6 часов после введения тестового лекарственного средства, через 17 и 19 дней после введения РТХ и до введения тестового лекарственного средства, через 22 дня после введения РТХ и после 3 дней периода каренции лекарственного средства, через 26 дней после введения РТХ и после 7 дней периода каренции лекарственного средства, и через 29 дней после введения РТХ и после 10 дней периода каренции лекарственного средства.

Экспериментальные условия можно изменять соответствующим образом.

Тестовый пример 3

Тест холодовой стимуляции 2

Эффект настоящего изобретения в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, также можно подтверждать, используя крыс, которым вводят РТХ аналогично тестовому примеру 2, и наблюдая аллодинию, индуцируемую холодовой стимуляцией описываемым ниже способом.

Крыс помещали в клетку, имеющую дно из проволочной сетки, и акклиматизировали в течение 1 часа, а затем распыляли 0,05 мл ацетона на задние конечности в течение 5 секунд с использованием MicroSprayer (PENN Century) для осуществления холодовой стимуляции с использованием охлаждающего действия, возникающего в момент испарения ацетона. Реакции избегания крыс наблюдали в течение 40 секунд с момента начала распыления и регистрировали время до возникновения реакции (латентные периоды). Тест осуществляли 3 раза для каждой из правой и левой конечностей и вычисляли среднее. Измерение можно осуществлять за 5 часов до введения РТХ, через 1 час после введения РТХ, через 2, 3, 5, 7, 9 и 11 дней после введения РТХ, через 15 дней после введения РТХ и до введения тестового лекарственного средства, через 15 дней после введения РТХ и через 6 часов после введения тестового лекарственного средства, через 17 и 19 дней после введения РТХ и до введения тестового лекарственного средства, через 22 дня после введения РТХ и после 3 дней периода каренции лекарственного средства, через 26 дней после введения РТХ и после 7 дней периода каренции лекарственного средства, и через 29 дней после введения РТХ и после 10 дней периода каренции лекарственного средства.

Экспериментальные условия можно изменять соответствующим образом.

Тестовый пример 4

Действие на аллодинию у крыс, индуцируемую оксалиплатином

Аналогично тестовым примерам 1-3, осуществляли тест фон Фрея и тест холодовой стимуляции с введением оксалиплатина с использованием крыс.

С помощью этих тестовых примеров можно подтверждать эффект настоящего изобретения в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством.

Тестовый пример 5

Денатурация нейронов *in vitro*

С помощью следующего способа можно подтверждать эффект облегчающего периферическую нейропатию действия настоящего изобретения.

Для исследования действия на денатурацию нейронов, индуцируемую обработкой паклитакселом, использовали клетки феохромоцитомы надпочечника крысы 12 (PC 12) и клетки дорзальных корешковых ганглиев (DRG), являющиеся модельными клеточными линиями дифференцировки нейронов и удлинения аксона.

(1) Культура клеток

Клетки PC 12 культивировали при 37°C в инкубаторе с атмосферой 5% CO₂ с использованием среды RPMI1640 (MP Biomedicals), содержащей 5% эмбриональную телячью сыворотку, 10% лошадиную сыворотку и 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина (Gibco BRL). Клетки DRG выделяли из самца крысы SD и культивировали в качестве первичной культуры, а затем 5 узелков DRG L4 и L5 обрабатывали коллагеназой типа I (Funakoshi) и диспазой I (Sanko Junyaku), инокулировали на 24-луночный планшет и дополнительно культивировали. Культивирование осуществляли при 37°C в инкубаторе с атмосферой 5% CO₂ с использованием модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (среды DMEM, MP Biomedical), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку и 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина.

(2) Обработка лекарственным средством и измерение длины аксона

Клетки PC 12 инокулировали на 24-луночный планшет при плотности 10000 клеток/лунку, затем через 3 часа клетки обрабатывали 0,01 ммоль/л Fos-Choline, чтобы сделать возможным удлинение аксона, и через 24 часа клетки обрабатывали тестовым раствором. Клетки DRG культивировали в течение одной недели и после подтверждения адгезии клеток и удлинения аксона, их обрабатывали тестовым раствором. В качестве тестового раствора, добавляли только раствор 10 нг/мл паклитаксела или добавляли раствор 10 нг/мл паклитаксела и тестового лекарственного средства (от 10 нг/мл до 0,1 мг/мл). Через 24 и 96 часов после обработки тестовым раствором среду заменяли свежей средой, содержащей тестовое лекарственное средство, через 168 часов окрашивали только погибшие клетки с использованием раствора красителя трипанового синего и фотографировали клетки с использованием светового микроскопа (увеличение в 200 раз; 3 изображения/лунку). После фотографирования длину аксонов живых клеток измеряли с помощью аналитического программного обеспечения Image J.

Экспериментальные условия можно изменять соответствующим образом.

Тестовый пример 6

Действие на аллодинию у крыс, индуцируемую паклитакселом

Аналогично тестовому примеру 1, описываемым ниже способом исследовали действие тромбомодулина на аллодинию, индуцируемую механической стимуляцией, генерируемой при введении крысам противоракового средства паклитаксела. В качестве тестового лекарственного средства крысам интраперитонеально вводили TMD123 и осуществляли следующий тест.

(1) Получение модели аллодинии у крыс, индуцируемой введением паклитаксела

В качестве экспериментальных животных использовали самцов крыс Wistar возрастом

5-6 недель (от 200 до 250 г) и интраперитонеально вводили им 2 мг/кг РТХ. Введение осуществляли всего 4 раза через день (дни 0, 2, 4 и 6). Крысам из контрольной группы аналогично вводили 0,5 мл растворителя для РТХ, т.е. смешанного раствора 1:1 Cremophor EL и этанола, разбавленного до 1,5 мл физиологическим раствором.

5 (2) Введение тестового лекарственного средства

В эксперименте по оценке профилактического эффекта с использованием крыс экспериментальных животных делили на три группы, т.е. контрольную группу, группу введения РТХ и группу введения РТХ и 10 мг/кг тромбомодулина (группу введения РТХ+ТМ). В качестве профилактического введения крысам интраперитонеально вводили
10 ТМД123, представляющий собой тромбомодулин, один раз в сутки в течение 7 дней (10 мг/кг) со дня начала введения РТХ.

(3) Статистический анализ

Статистический анализ результатов осуществляли с использованием Н-критерия Краскела-Уоллиса и теста LSD-типа (наименьшая значимая разность) и определяли
15 критическое значение 5% или менее для определения наличия значимого различия. Значение символов, используемых на графиках, являлось следующим.

□* и □*: Сравнение измеряемых значений для контрольной группы и группы введения РТХ, символы представляют собой $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно

† и ††: Сравнение измеряемых значений для группы введения РТХ и группы введения
20 РТХ и тестового лекарственного средства, символы представляют собой $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно.

(4) Тест Рэндалла-Селитто

Указанных выше крыс подвергали измерению на основе теста давления на конечность, описываемого в Randall L.O. et al., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 1957, 111, 409-419 (тест Рэндалла-Селитто). А именно, на правую заднюю конечность постепенно все больше давили с использованием анализатора анальгезирующего эффекта со стимуляцией давлением, и в качестве порогового значения боли определяли давление, при котором каждая крыса демонстрировала аномальную звуковую реакцию или
30 реакцию избегания.

Результаты теста для профилактического введения ТМД123 с использованием крыс представлены на фиг.3. Хотя в группе введения РТХ пороговое значение боли (порог) значимо снижалось по сравнению с контрольной группой, такое снижение порогового значения, наблюдаемое в группе введения РТХ, значимо подавлялось в группе введения РТХ+ТМ. Кроме того, в тесте с использованием крыс снижение порогового значения, наблюдаемое в группе введения РТХ, значимо подавлялось в группе введения РТХ+ТМ в течение 28 дней.

Учитывая приведенные выше результаты, выявили, что тромбомодулин демонстрирует профилактический эффект в отношении механической аллодинии, индуцируемой РТХ, с лучшим быстрым действием и долговременностью.

40 Тестовый пример 7

Профилактический эффект в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, у человека

Например, при проведении химиотерапии из 12 курсов, каждый из которых состоит из двух недель, с использованием FOLFOX6, mFOLFOX6 или т.п., у пациента со злокачественной опухолью, такой как рак толстого кишечника, ТМД123 (например, Rescomodulin (зарегистрированная торговая марка), Asahi Kasei Pharma Corporation) вводят пациенту непосредственно перед, в течение или непосредственно после введения противоракового средства в каждом курсе.

После завершения химиотерапии, исследуя процент отсева при химиотерапии, частоту случаев периферической нейропатической боли, QOL, изменение лабораторных данных при исследовании свертывания крови, эффект в отношении опухоли и т.п., можно подтверждать профилактический эффект настоящего изобретения в отношении периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, у человека.

Тип противоракового средства, дозы противоракового средства и TMD123, режим введения, длительность курса, количество курсов и т.п. можно соответствующим образом изменять с учетом общеизвестных технических знаний.

Промышленная применимость

Лекарственное средство по настоящему изобретению является крайне эффективным для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством, и может значительно улучшать качество жизни пациентов, которое заметно ухудшается по причине периферической нейропатической боли, вызываемой лечением противораковым средством. Таким образом, лекарственное средство по настоящему изобретению применимо в области фармацевтической промышленности.

Формула изобретения

1. Лекарственное средство для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, индуцируемой химиотерапией, содержащее тромбомодулин в качестве активного ингредиента.

2. Лекарственное средство по п. 1, где тромбомодулин является растворимым тромбомодулином.

3. Лекарственное средство по п. 1 или 2, где тромбомодулин является тромбомодулином человека.

4. Лекарственное средство по п. 1 или 2, где периферическая нейропатическая боль представляет собой один или несколько типов симптомов, выбранных из онемения конечностей, боли в конечностях, снижения глубоких рефлексов сухожилий, снижения мышечной силы, аллодинии, гипералгезии и двигательной дисфункции.

5. Лекарственное средство по п. 1 или 2, где периферическая нейропатическая боль является аллодинией.

6. Лекарственное средство по п. 5, где аллодиния является механической аллодинией.

7. Лекарственное средство по п. 1 или 2, где противораковое средство при химиотерапии состоит из одного или нескольких типов средств, выбранных из группы, состоящей из таксановых лекарственных средств и препарата платины.

8. Лекарственное средство по п. 1, где противораковое средство при химиотерапии является паклитакселом.

9. Лекарственное средство по п. 1, где противораковое средство при химиотерапии вводят в соответствии с терапией FOLFOX или терапией FOLFIRI.

10. Лекарственное средство по п. 1 или 2, где тромбомодулин вводят периодически.

11. Лекарственное средство по п. 1, которое вводят пациенту со злокачественным новообразованием, страдающему одним или несколькими типами злокачественных новообразований, выбранных из группы, состоящей из рака яичников, немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, рака желудка, рака эндометрия, рака головы и шеи, карциномы пищевода, лейкоза, злокачественной лимфомы, опухоли детского возраста, множественной миеломы, злокачественной астроцитомы, нейроглиомы, трофобластической опухоли, герминогенной опухоли, рака легких,

опухоли яичка, рака мочевого пузыря, опухоли почечной лоханки, опухоли мочеиспускательного канала, рака предстательной железы, карциномы шейки матки, нейробластомы, мелкоклеточного рака легких, остеосаркомы, злокачественной мезотелиомы плевры, злокачественной остеомы и рака толстого кишечника.

5 12. Лекарственное средство для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, индуцируемой химиотерапией, вводимое совместно с противораковым средством, содержащее тромбомодулин в качестве активного ингредиента.

10 13. Лекарственное средство по п. 1 или 12, где тромбомодулин является пептидом, получаемым из трансформированной клетки, полученной трансфекцией клетки-хозяина с использованием ДНК, кодирующей указанную ниже аминокислотную последовательность (i-1) или (i-2), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина;

(i-1) аминокислотная последовательность SEQ ID NO:9 или 11 или

15 (i-2) аминокислотная последовательность указанной выше (i-1), дополнительно включающая замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков.

14. Лекарственное средство по п. 1 или 12, где тромбомодулин является пептидом, содержащим указанную ниже аминокислотную последовательность (i-1) или (i-2), и пептид является пептидом, имеющим функции тромбомодулина;

20 (i-1) аминокислотная последовательность в положениях 19-516 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 или 11 или

(i-2) аминокислотная последовательность указанной выше (i-1), дополнительно включающая замену, делецию или инсерцию одного или нескольких аминокислотных остатков.

25 15. Применение тромбомодулина для производства лекарственного средства для профилактического и/или терапевтического лечения периферической нейропатической боли, индуцируемой химиотерапией.

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Asahi Kasei Pharma Corporation

<120> Средство для профилактического и/или терапевтического лечения
периферической нейропатической боли, вызываемой противораковым средством

<130> F113070-WO

<150> JP 2012-125316

<151> 2012-05-31

<160> 13

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> человек

<400> 1

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

20 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 Val Arg His Ile

115 120 125

Gly Thr Asp Cys

130

<210> 2

<211> 396

<212> ДНК

<213> человек

<400> 2

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggcgc gcctgggggtt ccccgaccgc 60
tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagccctga accaaactag ctacctctgc 120
gtctgcgcgc agggcttcgc gccattccc cagagccgc acaggtgcc gatgttttgc 180
aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggetagctg tgagtgcct 240
gaaggctaca tcctggacga cggtttcac tgcacggaca tcgacgagtgc gaaaaacggc 300
ggcttctgct ccgggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggccc 360
gactcggccc ttgtccgcca cattggcacc gactgt 396

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> человек

<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
20 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

<210> 4

<211> 396

<212> ДНК

<213> человек

<400> 4

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggcgc gcctgggggtt ccccgaccgc 60

tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
 gtctgcgcgc agggcttcgc gccattccc cactagccgc acaggtgcc gatgttttgc 180
 aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcct 240
 gaaggctaca tcctggacga cggtttcac tcacaggaca tcgacgagtg cgaaaacggc 300
 ggcttctgct ccggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggccc 360
 gactcggccc ttgcccgcca cattggcacc gactgt 396

<210> 5

<211> 480

<212> PRT

<213> человек

<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
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val	Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys	240
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
His Arg Cys Glu Asp Val Asp	Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys	320
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
Pro His Arg Cys Gln Met Phe	Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp	400
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> ДНК

<213> человек

<400> 6

```

atgcttgggg tcttggtcct tggcgcgctg gccctggcgg gcctgggggtt ccccgacccc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctacccc 120
ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaatg 180
acagtgcgct cctcgggtgg tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttgggccgc ggcgctctg gatcggcctg cagctgccac ccggtgcgg cgaccccaag 300
cgcctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
agtgggggac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgtgtgc 420
tccgctgtcg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actgggtgtg 540
gagcccggcg ccggcgctgc gcgcgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcgggccgc 600
ggagcggact tccaggcgct gcgggtgggc agctccggcg cgggtggctcc cctcggctta 660
cagctaattg gcaccgcgcc gcccgagcg gtccaggggc actgggccag ggaggcgccg 720
ggcgcttggt actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
gggggtcccc gctgccagtg cccagccggc gccgcccctg aggagacgg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccaacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccgggtgc aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
gtcaacacac aggggtggct cgagtgcac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccggtga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggct tcgcgcccac tccccacgag 1200
ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggg 1380
accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgtcc gccacattgg caccgactgt 1440

```

<210> 7

<211> 480

<212> PRT

<213> человек

<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

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
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
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
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

<212> ДНК

<213> человек

<400> 8

atgcttgagg tctgtgtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgacccc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctacccc 120
ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaattg 180
acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttgcccgcc ggcgcctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
cgccctcggc cctgcgcggc ctccagtggt gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gccggttggt cgtcgtgtgtc 420
tccgtgtctg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtgt 480
aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtgt 540
gagcccgggc ccggggctgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcgccccc 600

ggagcggact tccaggcgct gccggtgggc agctccgccg cggtaggctcc cctcggctta 660
 cagctaattgt gcaccgcgcc gcccgagcgc gtccaggggc actggggccag ggaggcgccg 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
 ggggctcccc gctgccagtgc cccagccggc gccgcctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc actctcgcgt tcccaacccc 900
 gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccggtgcg aggcagtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgt 1020
 gtcaacacac agggtggtt cgagtgcac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggtc tcgcgcccat tccccacgag 1200
 ccgcacaggt gccagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgacccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagt ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggttc tgctcgggg tgtgccacaa cctccccgg 1380
 accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gccctgccc gccacattgg caccgactgt 1440

<210> 9

<211> 516

<212> PRT

<213> человек

<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 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 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> ДНК

<213> человек

<400> 10

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcttgggggtt ccccgcaccc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccgc 120
 ggccccgcga ccttctcaa tgccagtgcg atctgcgacg gactgcgggg ccacctaatg 180
 acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgtc atttcttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gttggccgcc ggccctctg gatcgccctg cagctgccac ccgctgcgg cgaccccaag 300
 cgctcgggc cctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtggggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gccggttggt cgtcgtgtgc 420
 tccgctgctg aggcactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagcccggc ccgcggtgc cgccgtctg atcacctacg gcaccccggt ccgggccgc 600
 ggagcggact tccaggcgt gccggtgggc agctccgccg cgggtggctcc cctcggctta 660
 cagctaattg gcaccgcgc gcccgagcg gtccaggggc actggggcag ggaggcgccg 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgcgatccct 780
 ggggctcccc gctgccagtg cccagccggc gccgacctg aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccaacccc 900
 gaccagccg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
 gtcaacacac aggttggtct cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080

gagtgtgtgg agcccggtga ccogtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaaa cttagctacct ctgcgtctgc gccgagggct tcgcgcccat tccccacgag 1200
ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
accagggcta gctgtgagtg ccotgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgctc gccacattgg caccgactgt 1440
gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agcccccgcc cagcccgacg 1500
cccggtccca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

<210> 11

<211> 516

<212> PRT

<213> человек

<400> 11

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
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
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
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

<210> 12

<211> 1548

<212> ДНК

<213> человек

<400> 12

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggcgg gcctgggggtt ccccgcaccc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcagc actgcttcgc gctctaccgc 120
 ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaata 180
 acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgac atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gttggcgccc ggcgctctg gatcggcctg cagctgccac ccggtgcgg cgaccccaag 300
 cgcctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtggggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgctgtc 420
 tccgctgtg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagcccgcg ccgcggtgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcggccgc 600
 ggagcggact tcaggcgct gccggtgggc agctccggcg cgggtggctc cctcggctta 660
 cagctaagt gcaccgcgc gcccgagcg gtccaggggc actgggccag ggaggcgccg 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
 ggggctcccc gctgccagt gccagccggc gccgcctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcacccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccaacccc 900
 gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
 gtcaacacac aggggtggct cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaaa ctactacct ctgcgtctgc gccgagggct tcgcgcccac tccccacgag 1200
 ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagt ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggg 1380
 accttcgagt gcatctcgcg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440

gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agcccccgcc cagccccgacg 1500

ccccggctcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

<210> 13

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая ДНК

<400> 13

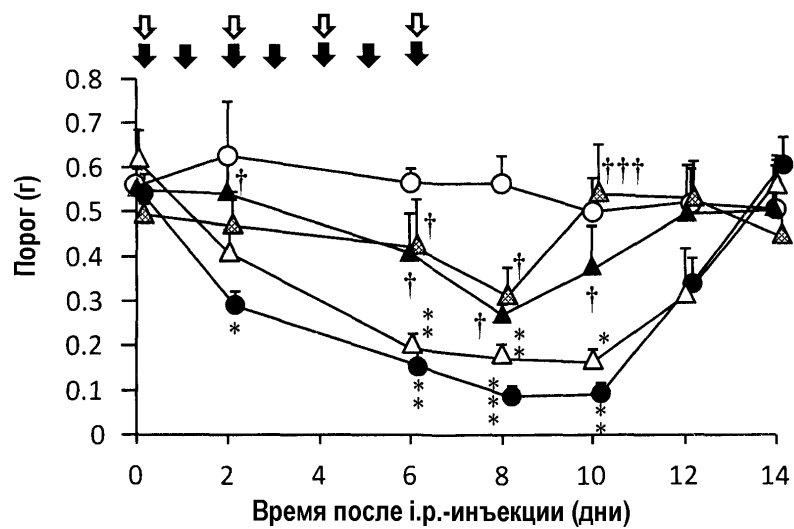
aatgtggcgg gcaagggccg a

21

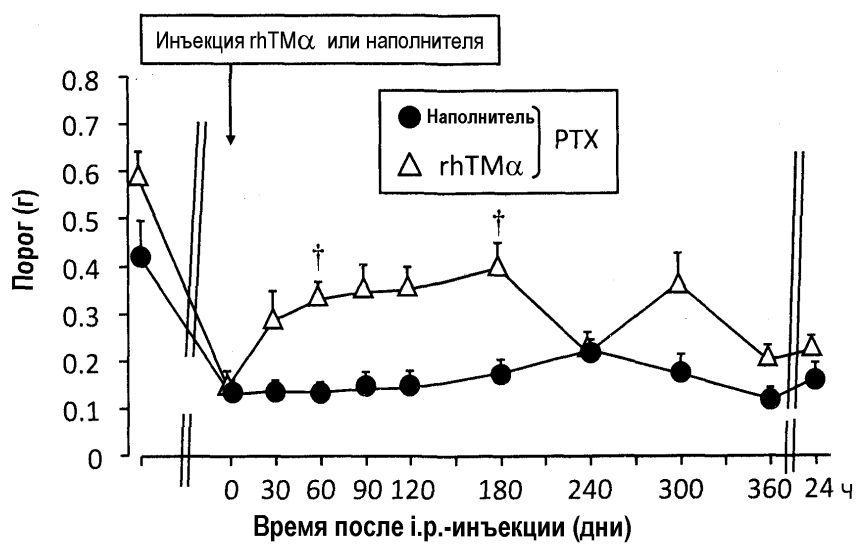
520253

1/2

ФИГ.1



ФИГ.2



2/2

ФИГ.3

