

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 586**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2019 PCT/JP2019/030133**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2020 WO20084853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2019 E 19875488 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024 EP 3871684**

54 Título: **Fármaco para el tratamiento y/o la mejora de septicemia asociada a anomalía de la coagulación**

30 Prioridad:

22.10.2018 US 201862748706 P

27.11.2018 US 201862771628 P

04.03.2019 US 201962813352 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2024

73 Titular/es:

ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)
1-1-2 Yurakucho, Chiyoda-ku
Tokyo 100-0006, JP

72 Inventor/es:

MATSUKI OSAMU;
TANAKA KOSUKE y
TANAKA RISA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 586 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fármaco para el tratamiento y/o la mejora de septicemia asociada a anomalía de la coagulación

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico y/o la mejora de la septicemia acompañada de coagulopatía.

10 Antecedentes de la técnica

La sepsis es un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) inducido por infección. Específicamente, la sepsis se define como una afección patológica que cumple, además de la presencia de infección, dos o más de los puntos del SIRS ((1) temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, (2) frecuencia cardíaca $> 90/\text{minuto}$, (3) frecuencia respiratoria $> 20/\text{minuto}$ o $\text{PaCO}_2 < 32$ torr, y (4) recuento de leucocitos $> 12.000/\mu\text{l}$ o $< 4000/\mu\text{l}$, o leucocitos inmaduros $> 10\%$). Aunque hasta la fecha se ha puesto el foco de forma significativa en la presencia de bacterias en sangre (bacteriemia), no se requiere necesariamente un resultado positivo en bacterias en el hemocultivo según la definición anterior. Entre las sepsis, una afección que presenta disfunción orgánica, hipoperfusión orgánica o hipotensión se denomina sepsis grave. La hipoperfusión o perfusión anormal de órganos incluye acidosis láctica, oliguria, nubosidad mental, y similares. Entre las sepsis graves, una afección que presenta continuamente hipotensión a pesar de una carga suficiente de fluidoterapia se denomina choque séptico (documento no de patente 1). Se considera que el fallo circulatorio observado en estas afecciones patológicas está provocado por un funcionamiento defectuoso del sistema nervioso simpático o un mediador liberado a partir de neutrófilos y similares, y la disfunción orgánica está provocada por hipoxia tisular (disoxia).

Se sabe que la trombomodulina es una sustancia que actúa uniéndose específicamente a la trombina para inhibir la actividad de coagulación sanguínea de la trombina y, al mismo tiempo, ejerce actividad anticoagulante para promover significativamente la capacidad de la trombina para activar la proteína C. También se sabe que la trombomodulina ejerce un efecto de prolongación del tiempo de coagulación por la trombina, o suprime la agregación plaquetaria provocada por la trombina. La proteína C es una proteína dependiente de la vitamina K que desempeña un papel importante en un sistema de coagulación sanguínea y fibrinólisis, y que se activa por la acción de la trombina para convertirse en proteína C activada. Se sabe que la proteína C activada inactiva el factor V de coagulación sanguínea activado y el factor VIII de coagulación sanguínea activado *in vivo*, y está implicada en la generación de un activador de plasminógeno que tiene acción trombolítica (documento no de patente 2). En consecuencia, se ha considerado que la trombomodulina promueve la activación de la proteína C por la trombina y, por lo tanto, es útil como anticoagulante o como trombolítico. También se ha informado de que, en un experimento con animales, la trombomodulina es eficaz para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un estado de hipercoagulabilidad (documento no de patente 3).

La trombomodulina se descubrió y se obtuvo por primera vez como una glicoproteína expresada en las células endoteliales vasculares de diversas especies animales, incluidos los seres humanos, y después se clonó con éxito. Específicamente, se clonó un gen de un precursor de trombomodulina humana que incluye un péptido señal a partir de una biblioteca de ADNc de pulmón humano mediante técnicas de ingeniería genética y se analizó la secuencia génica completa de la trombomodulina, y como resultado, se dio a conocer una secuencia de aminoácidos que consiste en 575 residuos que contienen un péptido señal (en general, se ejemplifica con 18 residuos de aminoácidos) (documento de patente 1). Se sabe que una trombomodulina madura, que se forma por escisión del péptido señal, está compuesta por 5 regiones, concretamente una región N-terminal (residuos de aminoácidos 1 a 226, estas posiciones se definen asumiendo que el péptido señal consiste en 18 residuos de aminoácidos, y lo mismo se aplicará a las siguientes descripciones), una región que tiene seis estructuras de tipo EGF (residuos de aminoácidos 227 a 462), una región de glicosilación unida a O (residuos de aminoácidos 463 a 498), una región transmembrana (residuos de aminoácidos 499 a 521) y una región citoplásmica (residuos de aminoácidos 522 a 557), partiendo del lado N-terminal del péptido maduro. También se sabe que una proteína parcial que tiene la misma actividad que la de la trombomodulina de longitud completa (es decir, una unidad activa mínima) consiste principalmente en la 4^a, 5^a y 6^a estructuras de tipo EGF partiendo del lado N-terminal en la región que tiene seis estructuras de tipo EGF (documento no de patente 4).

La trombomodulina de longitud completa apenas se disuelve en ausencia de un tensioactivo, y la adición de un tensioactivo es esencial para elaborar una preparación de trombomodulina completa. No obstante, se conoce una trombomodulina soluble que puede disolverse completamente incluso en ausencia de un tensioactivo. La trombomodulina soluble puede prepararse eliminando al menos una parte de la región transmembrana o la totalidad de la región transmembrana. Por ejemplo, se ha confirmado que una trombomodulina soluble que consiste en solo 3 regiones, concretamente la región N-terminal, la región que tiene seis estructuras de tipo EGF y la región de glicosilación unida a O (es decir, una trombomodulina soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 19 a 516 de la SEQ ID NO: 9) puede obtenerse aplicando técnicas de recombinación, y que la trombomodulina soluble recombinante resultante tiene la misma actividad que la de la trombomodulina de origen natural (documento de patente 1). También están disponibles otros informes sobre trombomodulinas solubles

(documentos de patente 2 a 9). Una trombomodulina soluble derivada de orina humana y similares también se consideran ejemplos de trombomodulinas nativas (documentos de patente 10 y 11).

Tal como se reconoce en muchos casos, como resultado de mutaciones espontáneas o mutaciones que se producen en el momento de la obtención, se han encontrado mutaciones polimórficas en los genes humanos. Actualmente, se han identificado proteínas trombomodulinas en las que el aminoácido presente en la posición 473 del precursor de trombomodulina humana que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en 575 residuos de aminoácidos se convierte en Val o Ala. En la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, esta variación del residuo de aminoácido corresponde a la mutación a T o C en la posición 1418 (documento no de patente 5). Sin embargo, los dos tipos de trombomodulinas son completamente idénticos en términos de su actividad y propiedades físicoquímicas, y se puede considerar que son sustancialmente idénticos.

Se ha descrito que la trombomodulina es eficaz para un tratamiento terapéutico de la coagulación intravascular diseminada (en lo sucesivo también denominada DIC) (documento no de patente 6). En cuanto al uso de trombomodulina, además del uso mencionado anteriormente, se espera que la trombomodulina se use en tratamientos terapéuticos y profilácticos de diversas enfermedades tales como síndrome coronario agudo (ACS), trombosis, obstrucción de vasos periféricos, arteriosclerosis obstructiva, vasculitis, trastorno funcional que se produce después de una cirugía cardíaca, complicación provocada por un trasplante de órganos, angina de pecho, ataque isquémico transitorio, toxemia del embarazo, diabetes, VOD hepática (enfermedad venooclusiva hepática, por ejemplo, hepatitis fulminante, enfermedad venooclusiva hepática que se produce después de un trasplante de médula ósea) y trombosis venosa profunda (DVT) y, además, sepsis y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS) (documentos de patente 12 a 14).

Se sabe que el índice internacional normalizado (en lo sucesivo también abreviado como "INR") en una muestra de plasma de un paciente con sepsis indica una coagulopatía. Por ejemplo, en el Congreso de medicina de cuidados críticos (CCM) celebrado en 2003, se informa de INR > 1,5 así como de aPPT > 60 segundos como criterios de coagulopatía (Crit. Care Med., 31, páginas 1250-1256 (2003)). Sin embargo, el valor de INR aún no se ha autorizado como un criterio claro, debido a que el valor no se ha verificado mediante ensayos clínicos y similares. En realidad, por medio de un ensayo clínico de fase III para el tratamiento de pacientes con sepsis grave, se ha informado que la tifacogina, como inhibidor de la ruta del factor tisular en una clase de anticoagulantes, ha logrado un resultado más favorable en un grupo de pacientes con INR ≤ 1,2 que en un grupo de pacientes con INR > 1,2 como resultado de una prueba clínica que se dirigió principalmente a pacientes con INR > 1,2 (JAMA, 9 de julio, Vol. 290, Nº 2, páginas 238-247 (2003)). Además, se ha informado de otro resultado de una prueba clínica relacionada con el tratamiento de sepsis por medio de trombomodulina, entre la clase de pacientes con INR > 1,2, en la que el fármaco ha logrado un mayor efecto en pacientes con INR > 1,5 que en pacientes con INR > 1,2 (documento de patente 13).

Tal como se ha explicado anteriormente, en el tratamiento terapéutico de pacientes con sepsis con un anticoagulante, se espera una alta eficacia al elegir una clase de pacientes acompañados de coagulopatía en vista de algunos de los resultados del estudio clínico. Sin embargo, se considera que la definición de coagulopatía todavía no se ha autorizado, porque, por ejemplo, también se obtuvieron resultados clínicos en sentido contrario. En otras palabras, no se ha aclarado cómo se puede obtener un resultado excelente mediante la elección de pacientes diana por medio del valor de INR, y no existe un conocimiento técnico común de qué nivel del valor de INR en un paciente con sepsis garantiza una eficacia particular del fármaco. Con respecto a la correlación del valor de INR con la eficacia clínica, se considera que solo una parte limitada de la correlación se ha conocido como base de caso por caso para algunos de los fármacos individuales.

En estas circunstancias, los inventores dedicaron su atención a la trombomodulina entre los anticoagulantes, y realizaron diversas investigaciones sobre el efecto terapéutico y/o de mejora contra la sepsis. Como resultado, descubrieron inesperadamente que la sepsis puede tratarse terapéuticamente y/o mejorarse de forma más eficaz en pacientes sépticos graves con una o más disfunciones orgánicas (excepto en pacientes sépticos graves que tienen disfunción orgánica limitada al hígado o riñón) que en pacientes sépticos graves sin disfunción orgánica cuando el valor de INR de los pacientes es superior a 1,4; en otras palabras, en cuanto al tratamiento terapéutico y/o la mejora de la sepsis por trombomodulina, los inventores descubrieron que existe una correlación particular entre pacientes sépticos graves con una o más disfunciones orgánicas, entre la clase de pacientes sépticos, y un valor de INR superior a 1,4, lo que es inesperado por un experto en la técnica. Además, sorprendentemente, los inventores descubrieron que, para pacientes sépticos graves con un valor de INR superior a 1,4 e igual o inferior a 1,6, se consiguió un efecto particularmente notable en el sentido de que la diferencia en la tasa de mortalidad entre el grupo de trombomodulina y el grupo de placebo era superior al 15% (documento de patente 13). Sin embargo, todavía no se ha elucidado completamente ningún procedimiento de administración para lograr dicho efecto clínico deseable.

Referencias del estado de la técnica

Documentos de patente

Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) Nº 64-6219

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa no examinada N° 5-213998

Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa no examinada N° 2-255699

5 Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa no examinada N° 3-133380

Documento de patente 5: Publicación de patente japonesa no examinada N° 3-259084

10 Documento de patente 6: Publicación de patente japonesa no examinada N° 4-210700

Documento de patente 7: WO92/00325

Documento de patente 8: WO92/03149

15 Documento de patente 9: WO93/15755

Documento de patente 10: Publicación de patente japonesa no examinada N° 3-86900

20 Documento de patente 11: Publicación de patente japonesa no examinada N° 3-218399

Documento de patente 12: WO03/061687

Documento de patente 13: WO2013/073545 y EP 2 781 221A1

25 Documentos no de patente

Documento no de patente 1: American College of Chest Physicians, CHEST/101/6-/JUNIO, 1992:1481-1483

30 Documento no de patente 2: Koji Suzuki, Igaku no Ayumi (Progress of Medicine), Vol. 125, 901 (1983)

Documento no de patente 3: K. Gomi et al., Blood, 75, 1396-1399 (1990)

Documento no de patente 4: M. Zushi et al., J. Biol. Chem., 246, 10351-10353 (1989)

35 Documento no de patente 5: D.Z. Wen et al., Biochemistry, 26, 4350-4357 (1987)

Documento no de patente 6: S.M. Bates et al., Br. J. Pharmacol., 144, 1017-1028 (2005)

40 Documento no de patente 7: Crit. Care Med. 31, 1250-1256 (2003)

Documento no de patente 8: JAMA, 290, 238-247 (2003)

45 Documento no de patente 9: "Results of Third Phase Clinical Trials for ART-123 in Overseas (informe preliminar)", <https://www.asahi-kasei.co.jp/asahi/jp/news/2018/me180802.html> (2 de agosto de 2018, Asahi Kasei Pharma Corporation)

50 Yoshimura et al. "Benefit profile of recombinant human soluble trombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis" *Critical Care* 19, 78 (2015) (<https://doi.org/10.1186/s13054-015-0810-3>) divulga un análisis de subgrupos de un estudio sobre el efecto sobre la mortalidad usando trombomodulina en pacientes con coagulación intravascular diseminada (DIC) inducida por sepsis.

Sumario de la invención

Objeto a lograr por la invención

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un medicamento para el tratamiento terapéutico eficaz y/o la mejora de la sepsis y similares acompañados de coagulopatía, y un procedimiento para el tratamiento terapéutico eficaz y/o la mejora de la sepsis y similares acompañados de coagulopatía.

60 Medios para lograr el objeto

65 Con el fin de lograr el objeto mencionado anteriormente, los inventores de la presente invención se centraron en la trombomodulina entre los anticoagulantes, y realizaron diversas investigaciones sobre el efecto terapéutico y/o de mejora de la misma para la sepsis. Como resultado, descubrieron que la sepsis de pacientes que se confirmó que estaba acompañada de coagulopatía inmediatamente antes de la administración de trombomodulina puede tratarse y/o mejorarse de forma extremadamente eficaz con trombomodulina. Los inventores de la presente invención

descubrieron además que mediante la administración por vía intravenosa de 0,005 a 1 mg/kg de trombomodulina a pacientes con sepsis acompañada de coagulopatía a una frecuencia de una vez al día durante al menos cuatro días consecutivos, la sepsis puede tratarse y/o mejorarse de forma extremadamente eficaz.

- 5 Los inventores de la presente invención también descubrieron que la sepsis de pacientes que se confirmó que tenían un número específico de tipos de disfunciones orgánicas inmediatamente antes de la administración de trombomodulina puede tratarse y/o mejorarse de forma extremadamente eficaz con trombomodulina. Yoshimura et al. "Benefit profile of recombinant human soluble trombomodulin in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: a multicenter propensity score analysis" *Critical Care* 19, 78 (2015) (<https://doi.org/10.1186/s13054-015-0810-3>)
- 10 divulga un análisis de subgrupos de un estudio sobre el efecto sobre la mortalidad mediante el uso de trombomodulina en pacientes con coagulación intravascular diseminada (DIC) inducida por sepsis.

Específicamente, la presente invención incluye lo siguiente:

- 15 Un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico y/o la mejora de la sepsis en un paciente, que comprende trombomodulina como principio activo, que se administra al paciente, y cuyo valor del complejo trombina-antitrombina (TAT) no es inferior a 10 ng/ml inmediatamente antes de la administración, o cuyo valor de actividad de la proteína C no es inferior al 40% inmediatamente antes de la administración.
- 20 En este caso, el término inmediatamente antes de la administración significa preferentemente dentro de un periodo de 24 horas calculado retrospectivamente desde el inicio de la administración de trombomodulina.

Efecto de la invención

- 25 Según la presente invención, la sepsis acompañada de coagulopatía puede tratarse y/o mejorarse eficazmente.

Breve descripción de los dibujos

- 30 [Fig. 1] La figura 1 muestra el protocolo de ensayo usado en los ejemplos, en el que 816 casos en total confirmados por satisfacer los criterios de coagulopatía y disfunción orgánica mencionados en el ejemplo 1 dentro de un periodo de 24 horas se aleatorizaron dentro de un periodo de 12 horas, la primera administración se realizó dentro de un periodo de 4 horas desde el momento de la aleatorización, en principio, y el recuento plaquetario, el valor de INR en plasma y similares se volvieron a medir en el momento de la primera administración como punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia). En el dibujo, R indica el punto temporal de finalización de la aleatorización.
- 35

Modos de llevar a cabo la invención

- 40 A continuación, se explicarán específicamente varias formas de realización preferidas de la presente invención (modos preferidos de llevar a cabo la invención, también denominados a continuación "formas de realización" en la memoria descriptiva). Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a las formas de realización específicas explicadas a continuación.

- 45 Se sabe que la trombomodulina de esta forma de realización tiene preferentemente una acción de (1) unión selectiva a la trombina (2) para promover la activación de la proteína C por la trombina. Además, se prefiere que se confirme que la trombomodulina posee generalmente (3) una acción de prolongación del tiempo de coagulación de la trombina, (4) una acción de supresión de la agregación plaquetaria provocada por la trombina y/o (5) una acción antiinflamatoria. Tales acciones que posee la trombomodulina pueden denominarse actividades de trombomodulina.

- 50 Como actividades de trombomodulina, la trombomodulina tiene preferentemente las acciones (1) y (2) mencionadas anteriormente, y de forma más preferida tiene las acciones (1) a (4) mencionadas anteriormente. Como actividades de trombomodulina, la trombomodulina tiene de forma más preferida todas las acciones (1) a (5) mencionadas anteriormente.

- 55 La acción de la trombomodulina de unión a la trombina puede confirmarse mediante los procedimientos de estudio descritos en diversas publicaciones conocidas tales como *Thrombosis and Haemostasis*, 70(3):418-422 (1993) y *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 9, páginas 4872-4876 (1989). En cuanto a la acción de promover la activación de la proteína C por la trombina, el grado de la actividad promotora de la activación de la proteína C, o la presencia o ausencia de la acción, pueden confirmarse fácilmente mediante los procedimientos de estudio descritos claramente
- 60 en diversas publicaciones conocidas que incluyen, por ejemplo, la publicación de patente japonesa no examinada N° 64-6219. Además, la acción de prolongación del tiempo de coagulación de la trombina y/o la acción de supresión de la agregación plaquetaria provocada por la trombina pueden confirmarse de forma similar fácilmente. Además, la acción antiinflamatoria también se puede confirmar mediante los procedimientos de estudio descritos en diversas publicaciones conocidas, incluidas, por ejemplo, *Blood*, 112:3361-3670 (2008) y *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 5:1267-1274 (2005).
- 65

La trombomodulina utilizada por la presente invención no está particularmente limitada siempre que posea actividades de trombomodulina. La trombomodulina es preferentemente una trombomodulina soluble en condiciones carentes de tensioactivos. La solubilidad de la trombomodulina soluble en agua, tal como agua destilada usada para inyección (en ausencia de un tensioactivo tal como Triton X-100 o polidocanol, y generalmente a un intervalo de pH aproximadamente neutro) es preferentemente, por ejemplo, de 1 mg/ml o superior o de 10 mg/ml o superior; preferentemente de 15 mg/ml o superior o de 17 mg/ml o superior; de forma más preferida de 20 mg/ml o superior, de 25 mg/ml o superior, o de 30 mg/ml o superior; de forma particularmente preferida de 60 mg/ml o superior. En algunos casos, la solubilidad es, por ejemplo, de 80 mg/ml o superior, o de 100 mg/ml o superior. Para determinar si una trombomodulina soluble se disuelve o no con éxito, se entiende que la apariencia transparente de una solución y la ausencia de sustancias insolubles aparentemente observables sirven como criterios sencillos, después de que la trombomodulina soluble se disuelva y la solución se observe por inspección visual, por ejemplo, justo debajo de una luz blanca en una posición correspondiente a una iluminación de aproximadamente 1000 luxes. También es posible observar la presencia o ausencia de residuos después de una filtración.

El peso molecular de la trombomodulina no está limitado mientras posea las actividades de trombomodulina tal como se han descrito anteriormente. El peso molecular es preferentemente de 100.000 o inferior, de forma más preferida de 90.000 o inferior, de forma aún más preferida de 80.000 o inferior, de la forma más preferida de 70.000 o inferior, y el peso molecular es preferentemente de 50.000 o superior, de la forma más preferida de 60.000 o superior. El peso molecular de la trombomodulina soluble puede medirse fácilmente mediante procedimientos ordinarios para medir el peso molecular de proteínas. Se prefiere la medición por espectrometría de masas, y es más preferido el procedimiento de MALDI-TOF-MS. Para obtener trombomodulina soluble que tenga un peso molecular dentro de un intervalo deseado, una trombomodulina soluble, que se obtiene mediante el cultivo de una célula transformante preparada transfectando una célula huésped con un ADN que codifica trombomodulina soluble usando un vector, puede someterse a fraccionamiento utilizando cromatografía en columna o similares tal como se describe más adelante.

La trombomodulina utilizada para la presente invención comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos de las posiciones 19 a 132 de la SEQ ID NO: 1, que se conoce como la porción central de las actividades de trombomodulina de la trombomodulina humana, y la trombomodulina no está particularmente limitada, siempre que la trombomodulina comprenda la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos de las posiciones 19 a 132 de la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos de las posiciones 19 a 132 de la SEQ ID NO: 1 puede mutarse de forma natural o artificial, siempre que la secuencia tenga la acción de promover la activación de la proteína C por la trombina, es decir, una de las actividades de trombomodulina. Específicamente, la secuencia puede comprender la sustitución, la delección o la adición de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos de las posiciones 19 a 132 de la SEQ ID NO: 1. El nivel aceptable de la mutación no está particularmente limitado, siempre que la secuencia de aminoácidos posea las actividades de trombomodulina. Un ejemplo incluye una homología del 50% o superior en secuencias de aminoácidos, y la homología es preferentemente del 70% o superior, de forma más preferida del 80% o superior, de forma aún más preferida del 90% o superior, de forma particularmente preferida del 95% o superior, y de la forma más preferida del 98% o superior. Dicha secuencia de aminoácidos mutada que incluye la sustitución, la delección o la adición de uno o más residuos de aminoácidos se denomina secuencia de mutación homóloga. Tal como se describe más adelante, estas secuencias de aminoácidos mutadas pueden producirse fácilmente usando técnicas de manipulación génica ordinarias. La trombomodulina no está particularmente limitada siempre que posea la secuencia mencionada anteriormente y la acción de unión selectiva a la trombina para promover la activación de la proteína C por la trombina al menos como la trombomodulina completa, pero la trombomodulina preferentemente también posee la acción antiinflamatoria.

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

Tal como se ha descrito anteriormente, aunque la trombomodulina usada por la presente invención no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 132 de la SEQ ID NO: 1 o 3, o una secuencia de mutación homóloga de la misma, y comprenda al menos una secuencia peptídica que tenga las actividades de trombomodulina, los ejemplos preferidos de la trombomodulina incluyen un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 132 o 17 a 132 de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, y un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia mencionada anteriormente y que tiene al menos las actividades de trombomodulina. Es más preferido un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 132 de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. En otra forma de realización, es más preferido un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia de la posición 19 a 132 o 17 a 132 de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 y que posee al menos las actividades de trombomodulina.

Como otra forma de realización de la trombomodulina para su uso según la presente invención, la trombomodulina comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos de las posiciones 19 a 480 de la SEQ ID NO: 5, no estando particularmente limitada siempre que la trombomodulina comprenda la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 480 de la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de las posiciones 19 a 480 de la SEQ ID NO: 5 puede ser una

secuencia de mutación homóloga de la misma, siempre que la secuencia posea la acción de promover la activación de la proteína C por la trombina, es decir, una de las actividades de trombomodulina.

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

10 Tal como se ha descrito anteriormente, aunque la trombomodulina usada para la presente invención no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de la posición 19 a 480 de cualquiera de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de mutación homóloga de la misma, y comprenda al menos una secuencia peptídica que posea las actividades de trombomodulina, los ejemplos preferidos de la trombomodulina incluyen un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 480 o 17 a 480 de cualquiera de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, y un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia mencionada anteriormente y que posee al menos las actividades de trombomodulina. Es más preferido un péptido que
15 consiste en la secuencia de la posición 19 a 480 de la SEQ ID NO: 5 o 7. En otra forma de realización, es más preferido un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia de la posición 19 a 480 o 17 a 480 de cualquiera de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, y que posee al menos las actividades de trombomodulina.

20 Como otra forma de realización de la trombomodulina para su uso según la presente invención, la trombomodulina comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de la SEQ ID NO: 9, no estando particularmente limitada siempre que la trombomodulina comprenda la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de la SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de la SEQ ID NO: 9 puede ser una secuencia de mutación homóloga de la misma, siempre que la secuencia posea la acción de promover la activación de la proteína C por la trombina, es decir, las actividades de trombomodulina.

25 La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 comprende la mutación de Val como el aminoácido de la posición 473 de la SEQ ID NO: 9 a Ala. La trombomodulina usada para la presente invención también comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de la SEQ ID NO: 11.

30 Tal como se ha descrito anteriormente, aunque la trombomodulina usada por la presente invención no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de la posición 19 a 515 de cualquiera de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11, o una secuencia de mutación homóloga de la misma, y comprenda una secuencia peptídica que tenga al menos las actividades de trombomodulina, los ejemplos más preferidos incluyen un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 17 a 516, o 17 a 515 de cualquiera de la SEQ ID
35 NO: 9 o la SEQ ID NO: 11, y un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga de la secuencia mencionada anteriormente y que posee al menos las actividades de trombomodulina. Se prefiere particularmente un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 17 a 516, o 17 a 515 de la SEQ ID NO: 9. Una mezcla de los mismos también es un ejemplo preferido. En otra forma de realización, se prefiere particularmente un péptido que tiene la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 17 a 516, o 17 a 515 de la SEQ ID NO: 11. Una mezcla de
40 los mismos también es un ejemplo preferido. Además, un péptido que consiste en una secuencia de mutación homóloga del mismo y que tiene al menos las actividades de trombomodulina también es un ejemplo preferido. Se prefiere que la trombomodulina también posea acción antiinflamatoria.

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

55 Los ejemplos preferidos de trombomodulina usados para la presente invención también incluyen el péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 14 (462 residuos de aminoácidos), el péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (272 residuos de aminoácidos), y el péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 6 (236 residuos de aminoácidos) descritos en la publicación de patente japonesa no examinada N° 64-6219.

60 La trombomodulina usada para la presente invención no está particularmente limitada siempre que la trombomodulina tenga al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 132 de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. Como dicha trombomodulina, se prefiere un péptido que tenga al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 480 de cualquiera de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7, y es más preferido un péptido que tenga al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de cualquiera de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11. Un ejemplo más preferido del péptido que tiene al menos la secuencia de aminoácidos de la posición 19 a 515 de
65 cualquiera de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11 es un péptido que consiste en la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 19 a 514, 17 a 516, 17 a 515, o 19 a 514 de cualquiera de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.

Además, también es un ejemplo preferido una mezcla de péptidos, cada uno de los cuales consiste en la secuencia de la posición 19 a 516, 19 a 515, 19 a 514, 17 a 516, 17 a 515 o 17 a 514 de cualquiera de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.

Para una forma de realización, aunque la trombomodulina no está particularmente limitada siempre que sea la trombomodulina descrita anteriormente, un ejemplo incluye trombomodulina soluble. Para otra forma de realización, se puede tomar como ejemplo trombomodulina humana. Para otra forma de realización más, se puede tomar como ejemplo trombomodulina soluble humana. Para otra forma de realización más, se puede tomar como ejemplo trombomodulina alfa (producto de recombinación génica). La trombomodulina alfa (producto de recombinación génica) es un principio activo de Reomodulin (marca registrada), que está aprobado como producto farmacéutico en Japón. La trombomodulina alfa (producto de recombinación génica) también se denomina ART-123.

En el caso de la mezcla mencionada anteriormente, la relación de mezcla de un péptido que comienza desde la posición 17 y un péptido que comienza desde la posición 19 para cada una de las SEQ ID NO: 9 y 11 es, por ejemplo, de 30:70 a 50:50, preferentemente de 35:65 a 45:55.

Además, la relación de mezcla de un péptido que termina en la posición 514, un péptido que termina en la posición 515 y un péptido que termina en la posición 516 para cada una de las SEQ ID NO: 9 y 11 es, por ejemplo, de 0:0:100 a 0:90:10, o de 0:70:30 a 10:90:0, o de 10:0:90 a 20:10:70, si se desea.

La relación de mezcla de los péptidos puede determinarse mediante un procedimiento ordinario.

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

Tal como se describe más adelante, estas trombomodulinas para su uso según la presente invención pueden obtenerse a partir de células transformantes preparadas transfectando células huésped con un ADN que codifica cada péptido (específicamente, las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y similares) usando un vector.

Es suficiente con que estos péptidos solo tengan las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, y pueden o no presentar unida una cadena de azúcar, lo que no está particularmente limitado. En las técnicas de manipulación génica, el tipo de cadena de azúcar, la posición en la que se añade una cadena de azúcar y el nivel de adición de la misma difieren dependiendo del tipo de células huésped usadas, y puede usarse cualquier técnica. En cuanto a la posición de unión de una cadena de azúcar y el tipo de la misma, se conocen hechos descritos en la publicación de patente japonesa no examinada N° 11-34199, y puede haberse añadido a las trombomodulinas según la presente invención la misma cadena de azúcar en la misma posición. Dos tipos de cadenas de azúcar unidas a N, las de tipo fucosil biantenarico y de tipo fucosil triantenarico, pueden unirse a la trombomodulina de esta forma de realización, y la relación de las mismas es, por ejemplo, de 100:0 a 60:40, preferentemente de 95:5 a 60:40, de forma más preferida de 90:10 a 70:30. La relación de estas cadenas de azúcar puede medirse en un mapa bidimensional de cadenas de azúcar descrito en Biochemical Experimental Methods, Vol. 23, Methods of Investigations on Glycoprotein Sugar Chains, Japan Scientific Societies Press (1990), y similares. Además, cuando se examina la composición de azúcar de la trombomodulina de esta forma de realización, se detectan sacáridos neutros, aminosacáridos y ácido siálico, cuyo contenido puede ser, en cada caso independientemente, por ejemplo, del 1 al 30%, preferentemente del 2 al 20%, de forma más preferida del 5 al 10%, en términos de relación en peso con respecto al contenido de proteína. El contenido de azúcar puede medirse mediante los procedimientos descritos en Lecture of New Biochemical Experiments, Vol. 3, Sugar I, Glycoprotein (Libro 1), Tokyo Kagaku Dojin (1990) (sacáridos neutros: procedimiento de fenol-ácido sulfúrico, aminosacáridos: procedimiento de Elson-Morgan, ácido siálico: procedimiento de ácido peryódico-resorcinol).

Aunque el procedimiento para obtener trombomodulina no está limitado a obtenerla por manipulación genética tal como se describe más adelante, como secuencia señal que puede usarse para la expresión en la que la trombomodulina se obtiene por manipulación génica, puede usarse una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 18 de la SEQ ID NO: 9 y una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 16 de la SEQ ID NO: 9, y también pueden usarse otras secuencias señal conocidas tales como la secuencia señal del activador del plasminógeno tisular humano (publicación internacional WO88/9811).

Cuando se introduce una secuencia de ADN que codifica la trombomodulina en una célula huésped, los ejemplos de procedimientos preferidos incluyen un procedimiento de incorporación de una secuencia de ADN que codifica trombomodulina en, preferentemente, un vector, de forma más preferida un vector de expresión que puede expresarse en células animales, y después introducir el ADN con el vector. Un vector de expresión es una molécula de ADN que

está constituida por una secuencia promotora, una secuencia para la adición de un sitio de unión a ribosoma a ARNm, una secuencia de ADN que codifica una proteína que va a expresarse, una señal de corte y empalme, una secuencia terminadora para la terminación de la transcripción, una secuencia de origen de replicación y similares. Los ejemplos de vectores de expresión de células animales preferidos incluyen pSV2-X notificados por Mulligan R.C. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 2072 (1981)); pBP69T (69-6) notificado por Howley P.M. et al. (Methods in Enzymology, 101, 387 (1983), Academic Press), y similares. Además, también hay otra forma de realización preferida en la que se introduce ADN en un vector de expresión expresable en un microorganismo.

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

En un proceso de manipulación génica o un proceso de producción de péptidos, también se usan a menudo microorganismos tales como *Escherichia coli*. Se usa preferentemente un sistema huésped-vector adecuado para cada proceso, y también se puede seleccionar un sistema vector apropiado para las células huésped mencionadas anteriormente. Se ha clonado un gen de trombomodulina utilizado en una técnica de recombinación genética. Se han divulgado ejemplos de producción de trombomodulina mediante dicha técnica de recombinación genética, y además, también se conocen procedimientos para purificar trombomodulina para obtener un producto purificado de la misma (publicaciones de patente japonesa no examinadas N° 64-6219, 2-255699, 5-213998, 5-310787, 7-155176; y J. Biol. Chem., 264:10351-10353 (1989)). Por lo tanto, la trombomodulina utilizada para la presente invención puede producirse utilizando los procedimientos descritos en los informes mencionados anteriormente, o mediante procedimientos similares. Por ejemplo, la publicación de patente japonesa no examinada N° 64-6219 divulga la cepa DH5 de *Escherichia coli* K-12 (N° de acceso ATCC 67283) que contiene un plásmido pSV2TMJ2 que contiene un ADN que codifica la trombomodulina de longitud completa. También puede usarse esta cepa redepositada en el antiguo National Institute of Bioscience and Human-Technology (actualmente Independent Administrative Institution, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository) (*Escherichia coli* DH5/pSV2TMJ2) (FERM BP-5570). La trombomodulina según la presente invención puede prepararse mediante una técnica de manipulación génica conocida utilizando un ADN que codifica la trombomodulina de longitud completa como material de partida.

La trombomodulina de esta forma de realización puede prepararse mediante un procedimiento conocido convencionalmente o un procedimiento similar. Por ejemplo, puede remitirse al procedimiento mencionado anteriormente de Yamamoto et al. (publicación de patente japonesa no examinada N° 64-6219) o el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa no examinada N° 5-213998. Específicamente, por ejemplo, se prepara un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 a partir de un gen de trombomodulina de origen humano mediante una técnica de manipulación génica, y puede modificarse adicionalmente según se requiera. Para dicha modificación, para obtener un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12), los codones que codifican el aminoácido de la posición 473 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (en particular, el nucleótido de la posición 1418 de la SEQ ID NO: 10) se mutan mediante mutagénesis dirigida al sitio según el procedimiento descrito por Zoller M.J. et al. (Method in Enzymology, 100:468-500 (1983), Academic Press). Por ejemplo, usando un ADN sintético para la mutación que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13, el nucleótido T de la posición 1418 de la SEQ ID NO: 10 puede convertirse en el nucleótido C para obtener un ADN mutado.

El ADN preparado tal como se ha descrito anteriormente se incorpora, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO) para obtener células transformantes. Dichas células se someten a una selección apropiada, y la trombomodulina purificada mediante un procedimiento conocido puede producirse a partir de una solución de cultivo obtenida cultivando una célula seleccionada. Tal como se ha descrito anteriormente, el ADN (SEQ ID NO: 10) que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se transfecta preferentemente en la célula huésped mencionada anteriormente.

El procedimiento para producir trombomodulina de esta forma de realización no está limitado al procedimiento mencionado anteriormente. Por ejemplo, también es posible extraer y purificar la trombomodulina de la orina, sangre, otros fluidos corporales y similares, o extraer y purificar la trombomodulina de un tejido que produce trombomodulina o un cultivo del tejido mencionado anteriormente y similares. Además, la trombomodulina puede someterse adicionalmente a un tratamiento de escisión usando una proteasa, según se requiera.

Para el cultivo de la célula transformante mencionada anteriormente, se puede usar un medio usado para cultivo celular ordinario, y se prefiere cultivar la célula transformante en varios tipos de medios con antelación para elegir un medio óptimo. Por ejemplo, puede usarse como medio base un medio conocido tal como medio MEM, medio DMEM y medio 199 y puede usarse un medio mejorado adicional o un medio con suplementos añadidos para diversos medios. Los ejemplos del procedimiento de cultivo incluyen cultivo con suero, en el que el cultivo se realiza en un medio que

contiene suero sanguíneo, y cultivo sin suero, en el que el cultivo se realiza en un medio que no contiene suero sanguíneo. Aunque el procedimiento de cultivo no está particularmente limitado, se prefiere el cultivo sin suero.

Cuando se añade suero a un medio en el caso del cultivo con suero, se prefiere suero bovino. Los ejemplos de suero bovino incluyen suero bovino fetal, suero bovino de recién nacido, suero bovino de ternero, suero bovino adulto y similares, y cualquiera de estos ejemplos puede usarse siempre que el suero sea adecuado para el cultivo celular. Como medio exento de suero usado en el cultivo sin suero, se pueden usar medios disponibles en el mercado. Se comercializan medios exentos de suero adecuados para diversas células y, por ejemplo, para la célula CHO, se comercializan CD-CHO, CHO-S-SFMII y CHO-III-PFM por Invitrogen y se comercializan medio IS CHO, IS CHO-CD y similares por Irvine Scientific. Estos medios pueden usarse sin ningún tratamiento, o pueden mejorarse o se les puede añadir suplementos y usarse. Los ejemplos del medio exento de suero incluyen además el medio DMEM que contiene 5 mg/l de cada uno de insulina, transferrina y ácido selenioso. Tal como se ha descrito anteriormente, el medio no está particularmente limitado siempre que el medio puede utilizarse para producir la trombomodulina de esta forma de realización. El procedimiento de cultivo no está particularmente limitado, y puede usarse cualquiera de cultivo por lotes, cultivo repetitivo por lotes, cultivo semicontinuo, cultivo de perfusión y similares.

Cuando la trombomodulina usada para la presente invención se prepara mediante el procedimiento de cultivo celular mencionado anteriormente, puede observarse diversidad en el aminoácido N-terminal debido a la modificación postraduccional de la proteína. Por ejemplo, el aminoácido de la posición 17, 18, 19 o 22 de la SEQ ID NO: 9 puede servir como el aminoácido N-terminal. Además, por ejemplo, el aminoácido N-terminal puede modificarse de modo que el ácido glutámico de la posición 22 se cambie por ácido piroglutámico. Se prefiere que el aminoácido de la posición 17 o 19 sirva como el aminoácido N-terminal, y es más preferido que el aminoácido de la posición 19 sirva como el aminoácido N-terminal. Además, también hay otra forma de realización en la que el aminoácido de la posición 17 sirve como el aminoácido N-terminal, que es una forma de realización preferida. En cuanto a la modificación, la diversidad y similares mencionados anteriormente, se pueden mencionar ejemplos similares para la secuencia de la SEQ ID NO: 11.

Además, cuando la trombomodulina soluble se prepara utilizando un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10, se puede observar diversidad del aminoácido C-terminal, y se puede producir un péptido más corto en un residuo de aminoácido. Específicamente, el aminoácido C-terminal puede modificarse de modo que el aminoácido de la posición 515 sirva como aminoácido C-terminal, y además la posición 515 está amidada. Además, puede producirse un péptido más corto en dos residuos de aminoácidos. Específicamente, el aminoácido de la posición 514 puede servir como el aminoácido C-terminal. Por lo tanto, se puede producir cualquiera de los péptidos que tengan una diversidad significativa del aminoácido N-terminal y del aminoácido C-terminal, o una mezcla de los mismos. Se prefiere que el aminoácido de la posición 515 o el aminoácido de la posición 516 sirva como el aminoácido C-terminal, y es más preferido que el aminoácido de la posición 516 sirva como el aminoácido C-terminal. Además, también hay otra forma de realización en la que el aminoácido de la posición 514 sirve como el aminoácido C-terminal, que es una forma de realización preferida. En lo que respecta a la modificación, la diversidad y similares descritos anteriormente, lo mismo se aplicará a un ADN que tenga la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12.

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

A continuación, el aislamiento y la purificación de trombomodulina a partir de un sobrenadante de cultivo o cultivo obtenido tal como se ha descrito anteriormente se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos [editado por Takeichi Horio, *Tanpakushitsu/Koso no Kiso Jikken Ho* (Fundamental Experimental Methods for Proteins and Enzymes) (1981)]. Por ejemplo, se prefiere usar cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de adsorción, que utiliza una interacción entre trombomodulina y un soporte cromatográfico sobre el que se inmovilizan grupos funcionales que tienen una carga opuesta a la de trombomodulina. Otro ejemplo preferido es la cromatografía de afinidad que utiliza afinidad específica con trombomodulina. Los ejemplos preferidos de adsorbente incluyen trombina, que es un ligando de la trombomodulina, y un anticuerpo anti-trombomodulina. Como anticuerpo, se pueden utilizar anticuerpos anti-trombomodulina que tienen propiedades apropiadas o que reconocen epítopos apropiados. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, los descritos en la publicación de patente japonesa (Kokoku) N° 5-42920, las publicaciones de patente japonesa no examinadas N° 64-45398 y 6-205692 y similares. Otros ejemplos incluyen cromatografía de filtración en gel y ultrafiltración, que utilizan el tamaño molecular de la trombomodulina. Otros ejemplos incluyen además cromatografía hidrófoba que utiliza el enlace hidrófobo entre un soporte cromatográfico sobre el que se inmovilizan grupos hidrófobos, y una porción hidrófoba de trombomodulina. Además, puede usarse hidroxiapatita como soporte en cromatografía de adsorción, cuyos ejemplos incluyen, por ejemplo, los descritos en la publicación de patente japonesa no examinada N° 9-110900. Estos medios pueden usarse en combinación, según se requiera. Aunque el grado de purificación puede seleccionarse dependiendo del propósito de uso y similares, es deseable purificar la trombomodulina hasta que se obtenga una única banda como resultado de la electroforesis, preferentemente SDS-PAGE, o se obtenga un único pico como resultado de HPLC de filtración en gel o HPLC de fase inversa del producto aislado y purificado. Debe entenderse que, cuando se usan dos o más tipos de trombomodulinas, se prefiere que solo se obtengan sustancialmente las bandas de las trombomodulinas, y no es necesario obtener una

única banda.

Los ejemplos específicos del procedimiento de purificación usado en la presente invención incluyen un procedimiento de purificación que usa las actividades de trombomodulina como criterio, por ejemplo, un procedimiento de purificación que comprende purificar de forma no exhaustiva un sobrenadante de cultivo o un producto de cultivo con una columna de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow para recoger una fracción que tiene las actividades de trombomodulina; después purificar la fracción con una columna de afinidad, columna de DIP-trombina-agarosa (diisopropilfosforiltrombina agarosa), como la etapa de purificación principal, para recuperar una fracción que tiene actividades de trombomodulina potentes; después concentrar la fracción recuperada y realizar seguidamente una filtración en gel para obtener una fracción con actividad de trombomodulina como un producto purificado (Gomi K. et al., Blood, 75: 1396-1399 (1990)). Un ejemplo de las actividades de trombomodulina utilizadas como criterio es una actividad promotora de la activación de la proteína C por la trombina. Otros ejemplos preferidos del procedimiento de purificación se ejemplificarán más adelante.

Se selecciona una resina de intercambio iónico apropiada que tiene buenas condiciones de adsorción para la trombomodulina y se realiza la purificación por cromatografía de intercambio iónico. Un ejemplo particularmente preferido es un procedimiento que comprende el uso de Q-Sepharose Fast Flow equilibrada con un tampón Tris-HCl a 0,02 mol/l (pH 7,4) que contiene NaCl a 0,18 mol/l. Después de lavar según se requiera, la elución se puede realizar con un tampón Tris-HCl a 0,02 mol/l (pH 7,4) que contiene NaCl a 0,3 mol/l, por ejemplo, para obtener trombomodulina como un producto purificado de forma no exhaustiva.

A continuación, por ejemplo, una sustancia que tiene afinidad específica por la trombomodulina puede inmovilizarse sobre una resina para realizar la purificación por cromatografía de afinidad. Los ejemplos preferidos incluyen una columna de DIP-trombina-agarosa y una columna de anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina. En el caso de la columna de DIP-trombina-agarosa, la columna se equilibra de antemano con un tampón Tris-HCl a 20 mmol/l (pH 7,4) que contiene NaCl a 100 mmol/l y cloruro de calcio a 0,5 mmol/l, y el producto purificado de forma no exhaustiva mencionado anteriormente se carga entonces en la columna, se lava según se requiera, y después se eluye con, por ejemplo, un tampón Tris-HCl a 20 mmol/l (pH 7,4) que contiene NaCl a 1,0 mol/l y cloruro de calcio a 0,5 mmol/l para obtener trombomodulina como un producto purificado. En el caso de la columna de anticuerpos monoclonales anti-trombomodulina, un ejemplo del procedimiento comprende: poner en contacto una solución de anticuerpos monoclonales anti-trombomodulina en un tampón NaHCO_3 a 0,1 mol/l (pH 8,3) que contiene NaCl a 0,5 mol/l con Sepharose 4FF (GE Health Care Biosciences) activada con CNBr de antemano para obtener la resina Sepharose 4FF acoplada con los anticuerpos monoclonales anti-trombomodulina, equilibrar la resina cargada en una columna de antemano con, por ejemplo, un tampón fosfato a 20 mmol/l (pH 7,3) que contiene NaCl a 0,3 mol/l, lavar según se requiera, y después realizar la elución con un tampón glicina-HCl a 100 mmol/l (pH 3,0) que contiene NaCl a 0,3 mol/l. Un efluente puede neutralizarse con un tampón apropiado para obtener un producto como un producto purificado.

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

Además, también se prefiere intercambiar el tampón por filtración en gel. Por ejemplo, un producto altamente purificado concentrado por ultrafiltración puede cargarse en una columna Sephacryl S-300 o columna S-200 equilibrada con un tampón fosfato a 20 mmol/l (pH 7,3) que contiene NaCl a 50 mmol/l, y después desarrollarse para fraccionamiento con un tampón fosfato a 20 mmol/l (pH 7,3) que contiene NaCl a 50 mmol/l. La actividad promotora de la activación de la proteína C por trombina puede confirmarse recogiendo una fracción activa y, de este modo, se obtiene un producto altamente purificado con tampón intercambiado. A fin de mejorar la seguridad, un producto altamente purificado obtenido tal como se ha descrito anteriormente se filtra preferentemente a través de un filtro apropiado para eliminar virus tal como Planova 15N (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), y después el producto resultante puede concentrarse por ultrafiltración hasta una concentración deseada. Finalmente, el producto se filtra preferentemente a través de un filtro de filtración aséptico.

Como una forma de realización de la presente invención, se proporciona un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico y/o la mejora de un paciente con sepsis que comprende trombomodulina como principio activo, que es para su administración al paciente, cuyo valor del complejo trombina-antitrombina (TAT) en la muestra de plasma del paciente no es inferior a 10 ng/ml inmediatamente antes de la administración.

Como otra forma de realización de la presente invención, también se proporciona un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico y/o la mejora de un paciente con sepsis que comprende trombomodulina como principio activo, que es para su administración al paciente, cuyo valor de actividad de proteína C en la muestra de plasma del paciente no es superior al 40% inmediatamente antes de la administración.

El término inmediatamente antes de la administración usado en las definiciones de las formas de realización de la presente invención significa dentro de un periodo de 24 horas, preferentemente 12 horas, de forma más preferida 8

horas, de forma más preferida 4 horas, de forma particularmente preferida 2 horas, calculado retrospectivamente desde el punto temporal de inicio de la administración de trombomodulina. Sin embargo, cuando se verifica que un paciente satisface las condiciones mencionadas anteriormente con una muestra de plasma del paciente recogida dentro de un periodo de 24 a 48 horas calculado retrospectivamente desde el punto temporal de inicio de la administración, también puede lograrse una alta eficacia en el paciente.

En cuanto al tratamiento terapéutico y/o la mejora de la sepsis, los ejemplos de efectos preferidos de la misma incluyen, por ejemplo, "prevención de la muerte de un paciente por sepsis". Los ejemplos también incluyen "prevención de agravamiento de las condiciones generales de un paciente por sepsis".

En cuanto al tratamiento terapéutico y/o la mejora de la sepsis, los ejemplos de efectos preferidos de la misma también incluyen, por ejemplo, "reducción de la tasa de mortalidad de pacientes con sepsis".

La elevación del nivel en sangre del dímero D, que es un marcador de coagulación sanguínea, puede sugerir el avance de la fibrinólisis (fibrinólisis secundaria o fibrinólisis) y similares, e indicar la formación de trombos de fibrina, que es una característica de las otras afecciones que acompañan a tromboembolismo e hipercoagulabilidad. Se prefiere que se observe una reducción de la concentración de dímero D en sangre o la supresión del aumento de la misma cuando se administra el medicamento de la presente invención a un paciente en comparación con cuando no se administra el medicamento.

El complejo trombina-antitrombina (TAT), que es un marcador de coagulación sanguínea, es un complejo que consiste en trombina y un inhibidor típico de la misma, antitrombina, que se unen entre sí en una relación de 1:1. En general, con la activación de la coagulación, una parte de la trombina se une rápidamente con la antitrombina para formar TAT. La concentración de TAT en sangre es normalmente inferior a aproximadamente 3 a 4 ng/ml. Midiendo la concentración de TAT en sangre, puede conocerse el grado de activación de la coagulación en el momento de la recogida de sangre. Se prefiere que se observe una reducción de la concentración de TAT en sangre o la supresión del aumento de la misma cuando se administra el medicamento de la presente invención a un paciente en comparación con cuando no se administra el medicamento.

El fragmento de protrombina 1+2 (F1+2) también se conoce como marcador de activación de la coagulación, como TAT, y es un péptido liberado de la protrombina en el momento de la conversión de protrombina en trombina. Se prefiere que se observe una reducción de la concentración del fragmento 1+2 de protrombina en sangre o la supresión del aumento de la misma cuando se administra el medicamento de la presente invención a un paciente en comparación con cuando no se administra el medicamento.

Se prefiere que se observe un aumento del recuento plaquetario o la supresión de la reducción del mismo cuando se administra el medicamento de la presente invención a un paciente en comparación con cuando no se administra el medicamento.

La antitrombina III (AT III) es uno de los anticoagulantes fisiológicos, y se une con un factor de coagulación sanguínea tal como el factor de activación X y el factor de activación II (trombina) en una relación de 1 a 1 para inhibir la acción de los mismos y, por lo tanto, mostrar una acción anticoagulante.

Las micropartículas (MP) son vesículas de membrana generadas a partir de diversas células tales como plaquetas, monocitos y células endoteliales vasculares, y se sabe que tienen una acción promotora de la coagulación sanguínea y una acción promotora de una reacción inflamatoria.

La sepsis a la que se hace referencia en esta forma de realización se conoce como una enfermedad infecciosa sistémica grave en la que los microorganismos invaden de forma continua o intermitente la sangre de un foco de infección, enfermedad que se induce por una enfermedad tal como enfermedades infecciosas, tumores malignos, cirrosis hepática, insuficiencia renal, diabetes y distocia, o un tratamiento terapéutico para una lesión o una enfermedad tal como el uso de catéter permanente, dispositivo de infusión, diálisis y similares y traqueotomía. Si los síntomas avanzan, se induce un choque sistémico por choque séptico, es decir, una disminución rápida de la presión arterial e insuficiencia circulatoria periférica, y la letalidad viene proporcionada por disfunciones orgánicas de órganos vitales, tales como pulmón, riñón, hígado, corazón, tubo digestivo y sistema nervioso central. Como complicación que acompaña a la sepsis, se encuentra inducido el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS) caracterizado por edema de estroma pulmonar, hemorragia e insuficiencia respiratoria aguda debido a obstrucción capilar pulmonar asociada con DIC o activación de neutrófilos y migración y acumulación de los mismos en parénquima pulmonar, lo que da como resultado un pronóstico extremadamente desfavorable.

La sepsis a la que se hace referencia en esta forma de realización es el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) inducido por infección. Más específicamente, incluye una afección patológica que cumple, además de la presencia de infección, dos o más de los puntos de SIRS ((1) temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, (2) frecuencia cardíaca $> 90/\text{minuto}$, (3) frecuencia respiratoria $> 20/\text{minuto}$, o $\text{PaCO}_2 < 32$ torr, y (4) recuento de leucocitos $> 12.000/\mu\text{l}$ o $< 4000/\mu\text{l}$, o bandemia $> 10\%$), y la sepsis puede diagnosticarse básicamente sobre la base a dicha afección patológica.

Existen varios procedimientos para diagnosticar la sepsis, y se resumen en Levy M. et al., Crit. Care. Med., 31:1250-1256. Por ejemplo, existe un procedimiento basado en el diagnóstico realizado por un médico, y un procedimiento de uso de valores de prueba y similares. Los ejemplos de este último incluyen un procedimiento en el que cuando se cumplen dos puntos de entre los cuatro puntos de (1) temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, (2) frecuencia cardíaca $> 90/\text{minuto}$, (3) frecuencia respiratoria $> 20/\text{minuto}$, o necesidad de respiración artificial, y (4) recuento de leucocitos $> 12.000/\mu\text{l}$ o $< 4000/\mu\text{l}$, o bandemia $> 10\%$, se establece el diagnóstico de SIRS, y si se confirma o se sospecha que un microorganismo es la causa del SIRS, se diagnostica como sepsis [LaRosa S., la página de inicio de The Cleveland Clinic]. Otro procedimiento similar al procedimiento anterior se describe en Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Crit. Care Med., 20, 864-874 (1992).

Los ejemplos de los síntomas de la sepsis incluyen, por ejemplo, bacteriemia, septicemia, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis (SIRS para el que se identifica o se sospecha que un microorganismo es la causa del mismo), sepsis grave, choque séptico, choque séptico intratable y síndrome de disfunción orgánica múltiple (en lo sucesivo también denominado MODS) (Harrison's Principles of Internal Medicine, 15ª edición del trabajo original, sección 124, página 828-833, Medical Science International, Ltd.). Las afecciones mencionadas anteriormente se ejemplifican como síntomas sobre los que es eficaz el medicamento de la presente invención para el tratamiento terapéutico y/o la mejora.

Aunque la sepsis no está particularmente limitada siempre que la enfermedad se diagnostique como sepsis sobre la base de los criterios de diagnóstico mencionados anteriormente, el objeto del uso del medicamento de la presente invención es la sepsis acompañada por coagulación anormal (sepsis con coagulopatía). Los ejemplos del índice de coagulopatía incluyen, por ejemplo, INR. Aunque la coagulopatía no está particularmente limitada siempre que el INR de una muestra de plasma obtenida del paciente sea superior a 1,2, es preferentemente superior a 1,3, de forma más preferida superior a 1,4.

Además, como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar la reducción anormal del recuento plaquetario (por ejemplo, trombocitopenia) en lugar del, o además del, INR. Su valor estándar mínimo es, por ejemplo, de $20.000/\text{mm}^3$, $25.000/\text{mm}^3$ o $30.000/\text{mm}^3$ y su valor estándar máximo es, por ejemplo, $200.000/\text{mm}^3$, $180.000/\text{mm}^3$ o $150.000/\text{mm}^3$. El intervalo preferido que indica una reducción anormal del recuento plaquetario puede ser un intervalo de recuento plaquetario no inferior a $30.000/\text{mm}^3$ e inferior a $150.000/\text{mm}^3$. El patrón que indica una reducción anormal del recuento plaquetario también puede ser una reducción del recuento plaquetario superior al 30% dentro de un periodo de 24 horas.

Como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar un aumento anormal en el valor del complejo trombina-antitrombina (TAT) en lugar del, o además del, INR. El valor estándar mínimo del mismo es, por ejemplo, 4 ng/ml, 8 ng/ml, 10 ng/ml o 12 ng/ml, y el valor estándar máximo del mismo es, por ejemplo, 2.000 ng/ml, 5.000 ng/ml o 10.000 ng/ml.

Como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar un aumento anormal en el valor del fragmento de protrombina 1+2 (F1+2) en lugar del, o además del, INR. El valor estándar mínimo del mismo es, por ejemplo, 200 pmol/l, 229 pmol/l, 230 pmol/l o 250 pmol/l, y el valor estándar máximo del mismo es, por ejemplo, 10.000 pmol/l, 20.000 pmol/l o 40.000 pmol/l.

Como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar una reducción anormal del valor de la proteína C en lugar del, o además del, INR. El valor estándar máximo del mismo es, por ejemplo, del 40%, 50% o 60%, y el valor estándar mínimo del mismo es, por ejemplo, del 5%, 8% o 10%.

Como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar un aumento anormal en el valor de micropartículas (MP) en lugar del, o además del, INR. El valor estándar mínimo del mismo es, por ejemplo, 5 nm, 8 nm o 10 nm, y el valor estándar máximo del mismo es, por ejemplo, 350 nm, 370 nm o 400 nm.

Como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar la reducción anormal del valor de antitrombina III (AT III) en lugar del, o además del, INR. El valor estándar máximo del mismo es, por ejemplo, del 45%, 60% o 70%, y el valor estándar mínimo del mismo es, por ejemplo, del 5%, 8% o 10%.

Como índice de coagulopatía en sepsis acompañada de coagulopatía, también se puede mencionar un aumento anormal en el valor del dímero D en lugar del, o además del, INR. El valor estándar mínimo del mismo es, por ejemplo, 2.000 ng/ml, 3.000 ng/ml o 3.500 ng/ml, y el valor estándar máximo del mismo es, por ejemplo, 50.000 ng/ml, 60.000 ng/ml o 70.000 ng/ml.

Aunque el tiempo desde 1) el punto temporal del diagnóstico, la determinación o la confirmación de si un paciente con sepsis es un paciente con sepsis acompañada de coagulopatía (punto temporal 1) hasta 2) el punto temporal de inicio del tratamiento terapéutico y/o la mejora del paciente usando el medicamento de la presente invención (punto temporal 2) no está particularmente limitado a menos que se desvíe del objeto de la presente invención, el tiempo desde el punto temporal 1 hasta el punto temporal 2 puede ser, por ejemplo, de 24 horas.

Los ejemplos de la bacteriemia incluyen una afección en la que la presencia de bacterias en la sangre se verifica mediante un resultado positivo del hemocultivo.

5 Los ejemplos de septicemia incluyen una afección en la que se confirma la presencia de microorganismos u otras toxinas en la sangre, pero puede ser una afección patológica que cumple, además de la presencia de infección, dos o más de los puntos del SIRS ((1) temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$, (2) frecuencia cardíaca $> 90/\text{minuto}$, (3) frecuencia respiratoria $> 20/\text{minuto}$, o $\text{PaCO}_2 < 32$ torr, y (4) recuento de leucocitos $> 12.000/\mu\text{l}$ o $< 4000/\mu\text{l}$, o leucocitos inmaduros $> 10\%$), y no se requiere necesariamente un resultado positivo del hemocultivo.

10 Los ejemplos del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) incluyen una afección que es una etapa preliminar de DIC, tal como se ha descrito anteriormente.

15 Los ejemplos de sepsis grave incluyen sepsis acompañada de uno o más síntomas que incluyen disfunción orgánica tal como acidosis metabólica, hipoperfusión orgánica, encefalopatía aguda, oliguria, hipoxemia o coagulación intravascular diseminada e hipotensión. La sepsis que presenta disfunción orgánica, hipoperfusión orgánica o hipotensión se denomina sepsis grave. La hipoperfusión de órganos o perfusión anormal incluye acidosis láctica, oliguria, nubosidad mental, y similares. Entre la sepsis grave, una afección que presenta hipotensión persistente a pesar de la carga suficiente de fluidoterapia se denomina choque séptico.

20 Más específicamente, la sepsis grave a la que se hace referencia en esta forma de realización es la siguiente.

25 Los ejemplos del choque séptico incluyen una condición de hipotensión (presión arterial de 90 mmHg o inferior o inferior a la presión arterial habitual en 40 mmHg o superior), que no responde a la reanimación por reemplazo de líquidos y que va acompañada de insuficiencia orgánica.

Los ejemplos de choque séptico intratable incluyen una condición de choque séptico que continúa durante 1 hora o más, y que no responde a un hipertensor con fluidoterapia.

30 Los ejemplos del síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) incluyen una afección con funcionamiento deficiente de uno o más órganos, y que requiere intervención médica para mantener la homeostasis.

35 La puntuación Sofa (evaluación secuencial de insuficiencia orgánica) es un índice para el grado de disfunción de órganos vitales representado con un valor numérico, y el grado de disfunción orgánica se evalúa en cinco etapas de cero a cuatro puntos para seis puntos que incluyen órganos respiratorios, sistema de coagulación, función hepática, sistema cardiovascular, sistema nervioso central y función renal. Se cree que cuando la puntuación supera 5, la tasa de mortalidad se sitúa en aproximadamente el 20%. Esta puntuación es útil para estimar la gravedad de la sepsis. Además de la puntuación Sofa, también se conoce la puntuación II de Apache (evaluación de fisiología aguda y salud crónica), y esta es una puntuación que permite la predicción de la tasa de mortalidad y similares usando 12 índices relacionados con la respiración, la circulación y similares.

45 Aunque la enfermedad infecciosa que da lugar a sepsis no está particularmente limitada, los ejemplos incluyen neumonía (infección aguda de pulmón), infección del aparato urinario, infección entérica, infección del flujo sanguíneo y similares. La enfermedad infecciosa que da lugar a la sepsis con la que se usa el medicamento de la presente invención es preferentemente una enfermedad infecciosa distinta de infección del aparato urinario (infección aguda de pulmón, infección entérica, infección del flujo sanguíneo y similares).

50 El INR al que se hace referencia en esta forma de realización es uno de los criterios de examen que definen la coagulopatía sanguínea. INR significa un tiempo de protrombina (en lo sucesivo también abreviado como PT) normalizado en cuanto a las diferencias entre lotes de fabricación de preparaciones de tromboplastina. El INR se define generalmente de la forma siguiente:

Valor de INR = (Tiempo de coagulación (s) de la muestra de ensayo/Tiempo de coagulación (s) de la muestra de control)^(Valor del ISI)

55 En la ecuación, el tiempo de coagulación (s) de la muestra de ensayo representa el PT de la muestra de plasma de ensayo de un sujeto que se va a examinar, e ISI representa el índice de sensibilidad internacional.

60 Los ejemplos de la sepsis grave a la que se hace referencia en esta forma de realización incluyen sepsis acompañada de uno o más síntomas que incluyen disfunción orgánica, tal como acidosis metabólica, encefalopatía aguda, oliguria, hipoxemia o coagulación intravascular diseminada e hipotensión, tal como se ha descrito anteriormente. El término grave significa que la enfermedad se encuentra en una condición crítica para sustentar la vida. Los ejemplos de sepsis grave incluyen, en particular, sepsis acompañada de una o más disfunciones orgánicas. Aunque la disfunción orgánica no está particularmente limitada siempre que la disfunción orgánica se induzca por sepsis, la disfunción orgánica incluye preferentemente el fallo de un órgano que es esencial para sustentar la vida. Los ejemplos de una o más disfunciones orgánicas incluyen una o más disfunciones orgánicas seleccionadas del grupo que consiste en disfunción

orgánica circulatoria, disfunción orgánica respiratoria, disfunción renal y disfunción hepática, los ejemplos preferidos incluyen una o más disfunciones orgánicas seleccionadas del grupo que consiste en disfunción orgánica respiratoria, disfunción orgánica circulatoria y disfunción renal, y los ejemplos más preferidos incluyen una o más disfunciones orgánicas seleccionadas del grupo que consiste en disfunción orgánica respiratoria y disfunción orgánica circulatoria. Aunque el número de disfunciones orgánicas no está particularmente limitado siempre que el número sea uno o más, el número puede ser preferentemente dos o más. En particular, se prefiere que haya dos tipos de disfunciones orgánicas: disfunción orgánica respiratoria y disfunción orgánica circulatoria. La disfunción orgánica respiratoria y la disfunción orgánica circulatoria también pueden denominarse trastorno de la función respiratoria y trastorno de la función cardiovascular, respectivamente.

En esta forma de realización, puede preferirse que el número de disfunciones orgánicas del paciente sea uno o más y tres o menos. También puede preferirse que el paciente tenga al menos una disfunción orgánica circulatoria o una disfunción orgánica respiratoria como disfunción orgánica.

La disfunción orgánica circulatoria no está particularmente limitada siempre que sea una disfunción orgánica circulatoria conocida en general, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, disminución de la presión arterial y choque. Los ejemplos específicos incluyen las condiciones observadas después del uso de vasopresores. Como otro ejemplo, se puede mencionar una condición de valor de lactato en sangre arterial > 2 mmol/l.

La disfunción orgánica respiratoria no está particularmente limitada siempre que sea una disfunción orgánica respiratoria conocida en general, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, hipoxemia, lesión pulmonar aguda y disnea. Los ejemplos específicos incluyen condiciones para las que el uso de respirador artificial es deseable o indispensable.

La disfunción renal no está particularmente limitada siempre que sea una disfunción renal conocida en general, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, trastorno de la función renal, oliguria e insuficiencia renal. Los ejemplos específicos incluyen una condición de creatinina, pudiendo mencionarse 2,0 mg/dl.

La disfunción hepática no está particularmente limitada siempre que sea una disfunción hepática conocida en general, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, trastorno de la función hepática, ictericia, insuficiencia hepática y similares. Los ejemplos específicos incluyen una condición de bilirrubina $\geq 2,0$ mg/dl.

Estas disfunciones orgánicas son conocidas en general tal como se describe en publicaciones publicadas antes de la fecha de aplicación de la presente solicitud, por ejemplo, Funada H., "Elucidation and Treatment Strategy for Sepsis", Iyaku Journal Co., Ltd., p.38- (2006)), "Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2008" (Crit. Care Med., enero de 2008; 36(1): 296-327), y similares.

Se supone que la disfunción orgánica puede estar inducida por un factor distinto de la sepsis, tal como en el caso de la disfunción orgánica inducida por fármacos, y en consecuencia, es deseable que los pacientes que tienen disfunción orgánica limitada al hígado o al riñón estén excluidos de los pacientes sépticos graves. También se sabe que puede desarrollarse trombocitopenia como resultado de una disfunción orgánica. Aunque el recuento plaquetario en pacientes a los que se va a administrar el medicamento de esta forma de realización no está particularmente limitado siempre que el recuento plaquetario sea inferior a 300.000/ μ l, el recuento es preferentemente inferior a 200.000/ μ l, de forma más preferida inferior a 150.000/ μ l.

En esta forma de realización, se prefiere que la puntuación II de Apache (evaluación de fisiología aguda y salud crónica) del paciente sea inferior a 35. También puede ser, por ejemplo, 25 o superior.

En esta forma de realización, el valor de INR en una muestra de plasma de un paciente con sepsis no está particularmente limitado siempre que el valor sea superior a 1,4, y cuando INR sea superior a 1,4, la trombomodulina es más eficaz para pacientes con sepsis con una o más disfunciones orgánicas. El INR máximo puede ser, por ejemplo, 2,0 o inferior, preferentemente 1,9 o inferior, de forma más preferida 1,8 o inferior, de forma aún más preferida 1,7 o inferior, de la forma más preferida 1,6 o inferior. El valor también puede ser preferentemente 1,5 o inferior. También puede preferirse excluir un paciente con un valor de INR de 1,7.

La expresión "INR superior a 1,4" también puede indicarse como "INR $> 1,4$ ".

En esta forma de realización, la DIC es una enfermedad o un síndrome mediante la cual se generan grandes cantidades de sustancias que aceleran la coagulación sanguínea como resultado del daño tisular provocado por diversas enfermedades, de modo que la función de un sistema de coagulación se acelera excesivamente, se forman pequeños trombos en vasos sanguíneos generalizados (formación de microtrombos) que obstruyen los vasos pequeños, y al mismo tiempo, se consumen trombocitos o factores de coagulación necesarios para el control de la hemorragia, provocando de ese modo una anomalía de la coagulación. Específicamente, como resultado de la formación de fibrina en los vasos vasculares, se produce hemorragia debida a coagulopatía de consumo o insuficiencia orgánica debida a la formación de microtrombos. La DIC también se denomina síndrome de coagulación intravascular diseminada o síndrome de coagulación intravascular difusa.

La DIC tiene diversos tipos de síntomas clínicos dependiendo del tipo de afección patógena subyacente. Además de la observación de hemorragia o síntomas de órganos, un procedimiento preferido para diagnosticar una enfermedad como la DIC comprende mantener la puntuación de DIC basándose en varios valores de prueba tal como se describe a continuación y diagnosticar después la enfermedad como DIC cuando la puntuación de DIC ha alcanzado un determinado nivel. Los ejemplos de tales valores de prueba incluyen el recuento de plaquetas sanguíneas, la concentración de productos de degradación de fibrina/fibrinógeno (abreviados en lo sucesivo como FDP, a veces) formados por descomposición por plasmina, concentración de dímero D, concentración de fibrinógeno, tiempo de protrombina, y similares. Además, también es posible diagnosticar una determinada afección como preDIC basándose en una disminución de las plaquetas, un aumento en la concentración de dímero D o FDP, y similares sin mantener la puntuación de DIC (Masao Nakagawa, "Search report relating use of criteria of disseminated intravascular coagulation (DIC)", Equipo de estudio de investigación de enfermedades intratables (anormalidad en coagulación sanguínea), el Ministerio de Salud y Asuntos Sociales, Informe de estudio 1999, 1999: 65-72; Katsumi Deguchi, "Tentative plan regarding standards for initiation of early treatment of DIC", Equipo de estudio de investigación de enfermedades intratables (anormalidad en coagulación sanguínea), el Ministerio de Salud y Asuntos Sociales, Informe de estudio 1999, 1999: 73-77; y Katsumi Nakagawa y Hajime Tsuji, "Current diagnosis of DIC - Reports on results of inquiet survey" Clinical Blood. 1999, 40: 362-364).

En esta forma de realización, un paciente con sepsis con un valor de INR superior a 1,2, preferentemente superior a 1,3, de forma más preferida superior a 1,4, en una muestra de plasma del paciente puede denominarse paciente con DIC en un sentido amplio, y el medicamento para el tratamiento terapéutico y/o la mejora de la sepsis según esta forma de realización puede usarse como medicamento para el tratamiento terapéutico y/o la mejora de la DIC con un valor de INR superior a 1,4.

El medicamento de esta forma de realización también puede usarse para la DIC. La sepsis también se considera como SIRS inducida por la invasión clínica crítica de una infección, y se refiere estrechamente a la DIC en la que la enfermedad causante es una enfermedad infecciosa. La DIC a menudo se desarrolla simultáneamente con sepsis, y el medicamento de esta forma de realización también se puede usar para un paciente con sepsis de este tipo que desarrolle simultáneamente DIC. En otras palabras, el medicamento de esta forma de realización puede usarse para un paciente que padece o se sospecha que padece una de DIC y sepsis, o ambas.

En esta forma de realización, el INR se puede medir, por ejemplo, de la forma siguiente. Específicamente, se añaden tromboplastina tisular y Ca^{2+} al plasma (muestra de ensayo) obtenido añadiendo citrato sódico, se mide el tiempo (PT) requerido para la coagulación (precipitación de fibrina), y se establece la evaluación basándose en la relación relativa del tiempo en términos de segundos con respecto al de una muestra de control (relación de actividad). La relación de actividad puede obtenerse como "tiempo de coagulación (segundos) de la muestra de ensayo/tiempo de coagulación (segundos) de la muestra de control", pero la relación puede variar entre laboratorios en los que se implementa el ensayo debido a la diferencia en la sensibilidad de la tromboplastina tisular usada. El valor de INR se ideó para eliminar dicha variación, y al evaluar PT usando el valor de INR corregido con un índice de sensibilidad internacional (en lo sucesivo también abreviado como ISI), la variación causada por la diferencia de laboratorios puede eliminarse para obtener un resultado estándar. El ISI representa la diferencia con la muestra estándar internacional. El ISI se determina para cada reactivo de tromboplastina tisular, y se adjunta al reactivo. Los ejemplos del reactivo de tromboplastina incluyen Thromborel S (marca comercial registrada, Sysmex Corp.), Thromboplastin C+ (marca comercial registrada, Sysmex Corp.) y similares, pero sin limitarse a estos ejemplos. Thromborel S (marca registrada) usa tromboplastina de placenta humana (el valor del ISI es de aproximadamente 1,0), y Thromboplastin C+ (marca registrada) usa tromboplastina de cerebro de conejo (el valor del ISI es de aproximadamente 1,8).

El ISI se adjunta a cada reactivo de tromboplastina tisular, y se calcula el valor de INR según la ecuación mencionada anteriormente.

Aunque la muestra de control no está particularmente limitada siempre que la muestra sea un plasma humano normal combinado disponible comercialmente, se puede usar plasma humano normal combinado citrado (citrato de Na) disponible comercialmente, y similares, disponibles de, por ejemplo, Kojin-Bio Co., Ltd. o International Bioscience Inc.

Como tratamientos terapéuticos de la sepsis, dichos tratamientos básicos tal como se mencionan a continuación se realizan generalmente con referencia a publicaciones conocidas (Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: Crit. Care Med., 2008, 36:296-327; Crit. Care Med., 32(3), 1250-56 (2003)) y puede usarse tromboomodulina y otro medicamento en combinación. Sin embargo, el otro medicamento usado en combinación no se limita a los mencionados a continuación.

Cuando la hipotensión continúa en un paciente con choque séptico incluso después de que la presión venosa central (CVP) se eleve hasta un valor deseado, puede administrarse dopamina con el fin de elevar la presión arterial promedio hasta al menos 60 mmHg. Cuando la dosis de dopamina supera 20 $\mu\text{g/kg/minuto}$, puede administrarse adicionalmente otro vasopresor (normalmente norepinefrina).

Para el tratamiento terapéutico contra las bacterias causantes de la sepsis, generalmente se usa un antibiótico. Para la selección del antibiótico, se requiere una estimación bien fundamentada en la causa sospechosa, el signo clínico,

el conocimiento con respecto a los microorganismos y el conocimiento con respecto al patrón de sensibilidad común a una sala hospitalaria específica para pacientes hospitalizados, los resultados de la prueba de cultivo preliminar, y similares. La normalización intensiva del nivel de azúcar en sangre en pacientes con sepsis mejora el resultado clínico de los pacientes en condiciones críticas.

5 Cuando se usa un antibiótico, puede investigarse una muestra tal como sangre, fluido corporal o parte de la herida, y puede elegirse un fármaco eficaz para la bacteria causante. Por ejemplo, en el caso de choque séptico de causa desconocida, se pueden administrar gentamicina o tobramicina y una cefalosporina de tercera generación en combinación. Además, cuando se sospecha una infección por bacterias *Staphylococcus* o *Enterococcus* resistentes se administra adicionalmente vancomicina.

10 En general, la dosis se ajusta para mantener el nivel de azúcar en sangre de 80 a 110 mg/dl (4,4 a 6,1 mmol/l) mediante inyección intravenosa continua de insulina.

15 Puesto que la terapia con corticosteroides es eficaz para el tratamiento terapéutico de la sepsis, se puede administrar en una dosis complementaria.

A un paciente con alto riesgo de muerte (puntuación APACHE II ≥ 25 , fallo orgánico múltiple debido a sepsis, ARDS debido a choque séptico o sepsis), se puede administrar una proteína C activada recombinante (rhAPC, drotrecogina α) cuando no existen contraindicaciones (hemorragia y similares).

20 Aunque los pacientes diana son limitados, puede realizarse una transfusión de glóbulos rojos empaquetados con el objetivo de lograr una Hb de 7,0 a 9,0 g/dl.

25 En el caso de una alteración de la eritropoyesis en un paciente con sepsis debido a insuficiencia renal, se puede administrar eritropoyetina (EPO).

En el caso de sepsis grave, se puede administrar heparina a una dosis baja de heparina no fraccionada, o se puede administrar heparina de bajo peso molecular para la prevención de DVT.

30 El medicamento para su uso según la presente invención puede contener un vehículo. Como vehículo utilizable en la presente invención, se prefiere un vehículo soluble en agua, y habitualmente se prefiere un agente de tonicidad, agente tampón, potenciador de la viscosidad, tensioactivo, conservante, antiséptico, agente calmante, modificador del pH, o similares aceptables como aditivos farmacéuticos. Por ejemplo, el medicamento para su uso según la presente invención puede prepararse añadiendo sacarosa, glicerina, modificador del pH que consiste en una sal inorgánica, o similares como aditivos. Además, si es necesario, se pueden añadir aminoácidos, sales, carbohidratos, tensioactivos, albúmina, gelatina o similares tal como se divulga en las publicaciones de patente japonesa no examinadas N° 64-6219 y 6-321805. El procedimiento para añadir estos aditivos no está particularmente limitado. Sin embargo, en caso de preparar un producto liofilizado, los ejemplos incluyen, por ejemplo, un procedimiento que consiste en mezclar una solución que contiene al menos un agente terapéutico seleccionado de un inmunosupresor y un agente terapéutico para neoplasias malignas hematológicas, y una solución que contiene trombomodulina, a continuación añadir aditivos a la mezcla, y mezclar la mezcla resultante, y un procedimiento que consiste en mezclar aditivos con al menos un agente terapéutico seleccionado de un inmunosupresor y un agente terapéutico para neoplasias malignas hematológicas disuelto en agua, agua para inyección, o un tampón apropiado de antemano, añadir una solución que contiene trombomodulina a la mezcla, mezclar la mezcla resultante para preparar una solución, y liofilizar la solución, de las formas que se emplean comúnmente. Cuando el medicamento para su uso según la presente invención es un medicamento que comprende una combinación de los componentes del medicamento, cada componente se prepara preferentemente añadiendo un vehículo según un procedimiento de preparación apropiado. El medicamento para su uso según la presente invención puede proporcionarse en forma de una inyección, o en forma de una preparación liofilizada para disolverla en el momento de su uso.

55 En cuanto a la preparación del medicamento para su uso según la presente invención, se puede preparar una solución acuosa para inyección llenando una solución que contiene de 0,1 a 10 mg de trombomodulina, agua para inyección y aditivos en una ampolla o vial en un volumen de, por ejemplo, 0,5 a 10 ml. Los ejemplos del procedimiento de preparación también incluyen un procedimiento de congelación de dicha solución y secado de la solución congelada a presión reducida para preparar una preparación liofilizada.

60 El medicamento para su uso según la presente invención se administra de forma deseable mediante administración parenteral, tal como administración intravenosa, administración intramuscular y administración subcutánea. El medicamento también puede administrarse por administración oral, administración intrarrectal, administración intranasal, administración sublingual o similares. Cuando el medicamento para su uso según la presente invención es un medicamento que comprende una combinación de múltiples principios activos, cada principio activo del medicamento se administra preferentemente mediante un procedimiento de administración adecuado para el principio.

65 Los ejemplos de procedimientos para la administración intravenosa incluyen un procedimiento para administrar una dosis deseada del medicamento de una vez (administración de bolo intravenoso) y administración intravenosa por

infusión gota a gota.

El procedimiento de administración de una dosis deseada del medicamento de una vez (administración de bolo intravenoso) es preferible desde el punto de vista de que el procedimiento requiere solo un corto espacio de tiempo para su administración. Especialmente en el caso de pacientes con sepsis que a menudo necesitan tratamiento urgente, puede preferirse la administración en un corto espacio de tiempo. Cuando el medicamento se administra de una vez, el periodo de tiempo requerido para la administración usando una jeringa inyectable, en general, puede variar. En general, el periodo de tiempo requerido para la administración es, por ejemplo, de 5 minutos o inferior, preferentemente de 3 minutos o inferior, de forma más preferida de 2 minutos o inferior, de forma aún más preferida de 1 minuto o inferior, de forma particularmente preferida de 30 segundos o inferior, aunque depende del volumen que se vaya a administrar. Aunque el tiempo de administración mínimo no está particularmente limitado, el periodo de tiempo es preferentemente de 1 segundo o superior, de forma más preferida de 5 segundos o superior, de forma aún más preferida de 10 segundos o superior. La dosis no está particularmente limitada siempre que la dosis se encuentre dentro de la dosis preferida mencionada anteriormente. También es preferible la administración intravenosa por infusión gota a gota desde el punto de vista de que el nivel en sangre de trombomodulina puede mantenerse fácilmente constante.

Una dosis diaria del medicamento para su uso según la presente invención puede variar dependiendo de la edad, el peso corporal de los pacientes, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y similares. En general, la dosis máxima es preferentemente de 20 mg/kg o inferior, de forma más preferida de 10 mg/kg o inferior, de forma aún más preferida de 5 mg/kg o inferior, de forma particularmente preferida de 2 mg/kg o inferior, y de la forma más preferida de 1 mg/kg o inferior, y la dosis mínima es preferentemente de 0,001 mg/kg o superior, de forma más preferida de 0,005 mg/kg o superior, de forma aún más preferida de 0,01 mg/kg o superior, de forma particularmente preferida de 0,02 mg/kg o superior, y de la forma más preferida de 0,05 mg/kg o superior, en términos de la cantidad de trombomodulina.

En el caso de la administración de bolo intravenoso, aunque la dosis no está particularmente limitada siempre que la dosis se encuentre dentro de la dosis preferida mencionada anteriormente, la dosis diaria máxima es preferentemente de 1 mg/kg o inferior, de forma más preferida de 0,5 mg/kg o inferior, de forma aún más preferida de 0,1 mg/kg o inferior, de forma particularmente preferida de 0,08 mg/kg o inferior, y de la forma más preferida de 0,06 mg/kg o inferior, y la dosis mínima es preferentemente de 0,005 mg/kg o superior, de forma más preferida de 0,01 mg/kg o superior, de forma aún más preferida de 0,02 mg/kg o superior, y de forma particularmente preferida de 0,04 mg/kg o superior.

Cuando el medicamento para su uso según la presente invención se administra a un paciente que tiene un peso corporal superior a 100 kg, se puede administrar preferentemente a una dosis fija de 6 mg, ya que el volumen de sangre no es proporcional al peso corporal, y el volumen de sangre se reduce relativamente con respecto al peso corporal en dicho paciente.

En el caso de infusión intravenosa continua, aunque la dosis no está particularmente limitada siempre que la dosis se encuentre dentro de la dosis preferida mencionada anteriormente, la dosis diaria máxima es preferentemente de 1 mg/kg o inferior, de forma más preferida de 0,5 mg/kg o inferior, de forma aún más preferida de 0,1 mg/kg o inferior, de forma particularmente preferida de 0,08 mg/kg o inferior, y de la forma más preferida de 0,06 mg/kg o inferior, y la dosis mínima es preferentemente de 0,005 mg/kg o superior, de forma más preferida de 0,01 mg/kg o superior, de forma aún más preferida de 0,02 mg/kg o superior, y de forma particularmente preferida de 0,04 mg/kg o superior.

Cuando el medicamento para su uso según la presente invención se administra a un paciente que tiene un peso corporal superior a 100 kg, se puede administrar preferentemente a una dosis fija de 6 mg, ya que el volumen de sangre no es proporcional al peso corporal, y el volumen de sangre se reduce relativamente con respecto al peso corporal en dicho paciente.

El medicamento se administra una o varias veces al día según se requiera. En cuanto al intervalo de administración, el medicamento puede administrarse una vez cada 2 a 14 días, preferentemente una vez cada 2 a 7 días, de forma más preferida una vez cada 3 a 5 días.

[Explicación del listado de secuencias]

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen utilizado en la producción de TME456

SEQ ID NO: 2: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen utilizado en la producción de TME456M

SEQ ID NO: 4: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3

SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen utilizado en la producción de TMD12

SEQ ID NO: 6: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen utilizado en la producción de TMD12M

SEQ ID NO: 8: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen utilizado en la producción de TMD123

SEQ ID NO: 10: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 11: Secuencia de aminoácidos codificada por el gen utilizado en la producción de TMD123M

SEQ ID NO: 12: Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11

SEQ ID NO: 13: ADN sintético para mutación usado para llevar a cabo mutagénesis dirigida al sitio

Ejemplos

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

La trombomodulina para su uso según la presente invención usada en los ejemplos de ensayo se preparó según el procedimiento mencionado anteriormente de Yamamoto et al. (el procedimiento descrito en la publicación de patente japonesa no examinada N° 64-6219). A continuación se describen ejemplos de preparación de la misma. La seguridad de las trombomodulinas obtenidas en estos ejemplos de preparación se confirmó mediante ensayos de administración intravenosa únicos y repetitivos usando ratas y monos, ensayo de reproducción de ratón, ensayo de irritación local, ensayo de seguridad farmacológica, ensayo de inactivación de virus y similares.

[Ejemplo de preparación 1]

<Obtención de trombomodulina>

Se obtuvo un producto altamente purificado mediante el procedimiento mencionado anteriormente. Específicamente, se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (que consistía específicamente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10). A partir del cultivo de las células transformantes anteriores, se obtuvo un producto altamente purificado recogiendo una fracción activa con un tampón fosfato a 20 mmol/l (pH 7,3) que contenía NaCl a 50 mmol/l según el procedimiento de purificación convencional mencionado anteriormente. El producto se concentró adicionalmente usando una membrana de ultrafiltración para obtener una solución de trombomodulina que tenía una concentración de 11,0 mg/ml (en lo sucesivo también abreviada como TMD123 en la memoria descriptiva).

<Preparación de solución de polisorbato>

Se pesó polisorbato 80 (0,39 g) en un vaso de precipitados de vidrio, se añadió agua para inyección (30 ml) y se disolvió.

<Preparación y llenado de la solución de fármaco>

La solución de TMD123 obtenida anteriormente (2239 ml, correspondientes a 24,63 g de proteína trombomodulina soluble, añadida en una cantidad en exceso del 5%) se dispuso en un recipiente de acero inoxidable de 5 l. Posteriormente se añadió la solución de polisorbato obtenida anteriormente, y se añadió cloruro de sodio (27,9 g). Se añadió agua para inyección (600 ml) y la mezcla se agitó. La mezcla se ajustó a pH 6,0 añadiendo una solución de ácido clorhídrico 1 mol/l. Se añadió adicionalmente agua para inyección a la mezcla hasta una cantidad total de 3940 g, y la mezcla se mezcló uniformemente y se agitó. Esta solución de fármaco se sometió a esterilización por filtración usando un filtro que tenía un diámetro de poro de 0,22 µm (MCGL10S, fabricado por Millipore). El filtrado se introdujo en ampollas en una cantidad de 1,1 g cada una para obtener una preparación de TMD123.

[Ejemplo de preparación 2]

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

[Ejemplo de preparación 3]

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

[Ejemplo de preparación 4]

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

[Ejemplo de preparación 5]

Se transfectan células de ovario de hámster chino (CHO) con un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6), se obtiene trombomodulina purificada a partir de un cultivo de las células transformantes anteriores (en lo sucesivo también abreviada como TMD12 en la memoria descriptiva) mediante el procedimiento de purificación convencional mencionado anteriormente, y se obtiene una preparación de TMD12 de la misma manera que la descrita anteriormente.

[Ejemplo de preparación 6]

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

[Ejemplo de preparación 7]

Preparación de la formulación de placebo

<Preparación de solución de polisorbato>

Se pesó polisorbato 80 (0,4 g) en un vaso de precipitados de vidrio, se añadió agua para inyección (30 ml) y se disolvió.

<Preparación y llenado de la solución de fármaco>

Se dispuso agua para inyección (2000 ml) en un recipiente de acero inoxidable de 5 l. Posteriormente se añadió la solución de polisolvato obtenida anteriormente. Se añadió adicionalmente agua para inyección a la mezcla hasta una cantidad total de 4000 g, y la mezcla se mezcló uniformemente y se agitó. Esta solución de fármaco se sometió a esterilización por filtración usando un filtro que tenía un diámetro de poro de 0,22 µm (MCGL10S, fabricado por Millipore). El filtrado se introdujo en ampollas en una cantidad de 1,1 g cada una para obtener una preparación de placebo.

[Ejemplo 1]

<Procedimiento para el experimento>

Usando TMD-123 preparado según el Ejemplo de preparación 1 como trombomodulina, se realizó un estudio controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado para pacientes con sepsis grave acompañada de coagulopatía. El número de pacientes diana fue de 816 en total. De entre los mismos, se asignaron 402 pacientes al grupo de administración de TMD-123, y 414 pacientes al grupo de administración de placebo. El experimento se realizó con 800 pacientes de entre los mismos a los que se administró el fármaco en investigación (TMD-123 para 395 pacientes y placebo para 405 pacientes). Se administró TMD-123 una vez al día a una dosis de 0,06 mg/kg durante 6 días consecutivos como máximo mediante administración de bolo intravenoso. Como placebo, se usó la preparación fabricada según el Ejemplo de preparación 7. Para pacientes con un peso corporal superior a 100 kg, se administró

uniformemente una dosis fija de 6 mg una vez al día durante 6 días consecutivos mediante administración de bolo intravenoso con el fin de suprimir los efectos secundarios debidos a sobredosis.

En este experimento, la expresión de acompañada de coagulopatía se definió de forma de muestre 1) INR > 1,4 y 2) recuento plaquetario superior a 30.000/mm³ e inferior a 150.000/mm³ o disminución de plaquetas superior al 30% en 24 horas.

Los valores de INR en plasma de los pacientes antes de la administración del fármaco de ensayo se midieron mediante el procedimiento anterior descrito como la ecuación mencionada anteriormente. Los recuentos plaquetarios de los pacientes se midieron mediante un procedimiento que se usaba en sí mismo convencionalmente.

En este experimento, los pacientes diana fueron aquellos que tenían la siguiente disfunción orgánica a y/o disfunción orgánica b relevante para la sepsis.

1) Disfunción orgánica a: trastorno de la función cardiovascular que requiere tanto carga de fluidoterapia como un fármaco presor suficiente para mantener una presión arterial media de 65 mmHg o superior.

2) Disfunción orgánica b: trastorno de la función respiratoria que presenta una necesidad aguda de respiración artificial, y que muestra una relación PaO₂/FiO₂ inferior a 250 (o inferior a 200 cuando el sitio de infección es el pulmón).

Trastorno de la función respiratoria

El trastorno de la función cardiovascular mencionado anteriormente puede denominarse disfunción orgánica circulatoria. El trastorno de la función respiratoria mencionado anteriormente puede denominarse disfunción orgánica respiratoria.

En este experimento, el total de 816 pacientes que se confirmó que cumplían con los criterios mencionados anteriormente para la coagulopatía y los criterios mencionados anteriormente para la disfunción orgánica dentro de un periodo de 24 horas se aleatorizaron dentro de un periodo de 12 horas, y recibieron la primera administración dentro de un periodo de 4 horas, en principio, desde el punto temporal de la aleatorización. En el momento de la primera administración, se volvieron a medir el recuento plaquetario, el valor de INR en plasma y similares en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) (figura 1).

La expresión mencionada anteriormente "pacientes que se confirmó que cumplían con los criterios mencionados anteriormente para la coagulopatía y los criterios mencionados anteriormente para la disfunción orgánica dentro de un periodo de 24 horas" significa que el tiempo desde el punto temporal en el que los pacientes cumplían uno cualquiera de los criterios del valor de INR, el recuento plaquetario y la disfunción orgánica por primera vez hasta el momento en el que se confirmó que los pacientes cumplían con todos los demás criterios es de 24 horas o inferior. La expresión mencionada anteriormente "aleatorizaron dentro de un periodo de 12 horas" significa que el tiempo desde el punto temporal en el que se confirmó que los pacientes cumplían los criterios mencionados anteriormente para la coagulopatía y los criterios mencionados anteriormente para la disfunción orgánica hasta el punto temporal en el que se completa la obtención del consentimiento del paciente para participar en el ensayo clínico (consentimiento informado, IC), la confirmación de la competencia del paciente para participar en el ensayo clínico en el centro de coordinación clínica (CCC), el registro del ensayo clínico y la aleatorización es de 12 horas o inferior (figura 1).

Los resultados brutos se confirmaron el día 28 desde el inicio de la administración, y las tasas de mortalidad (mortalidad) de los grupos de pacientes se calcularon como un punto de evaluación de la eficacia principal. Las diferencias entre las tasas de mortalidad de los grupos de administración de TMD-123 y placebo se calcularon como Diferencia.

Como los principales puntos de evaluación de la seguridad, se observaron eventos adversos graves (SAE), eventos hemorrágicos importantes graves (MBE) y anticuerpos antifármaco (ADA).

<Resultados experimentales>

Los 800 casos mencionados anteriormente se definieron como el grupo máximo de objetos de análisis (conjunto de análisis completo, FAS), se analizaron la eficacia para el conjunto de análisis completo y las eficacias para subgrupos del mismo definidos según diversos puntos de vista (tabla 1).

[Tabla 1]

Nº	Grupo	Nº de casos	Tasa de mortalidad del grupo de administración de placebo (a) %	Tasa de mortalidad del grupo de administración de TMD-123 (b) %	Diferencia entre los grupos para de eficacia (a-b) %
1	Conjunto de análisis completo	800	29,383	26,835	2,55
2	VR INR > 1,4	654	32,537	28,527	4,01
	VR INR ≤ 1,4	146	14,286	19,737	-5,45
3	VR INR > 1,4 y PLT > 30.000 (mm ³)	634	32,110	26,710	5,40
	VR INR ≤ 1,4 y/o PLT ≤ 30.000 (mm ³)	166	17,949	27,273	-9,32
4	TAT ≥ 10 (ng/ml)	489	35,685	29,032	6,65
	TAT < 10 (ng/ml)	286	18,301	23,308	-5,01
5	Cuatro o más veces de administración	640	20,807	16,352	4,46
6	VR INR > 1,4 y 4 o más veces de administración	512	22,901	16,000	6,90
7	VR INR > 1,4, 4 o más veces de administración y PLT > 30.000 (mm ³)	503	22,568	15,447	7,12
8	VR INR > 1,4, TAT ≥ 10 (ng/ml) y PLT > 30.000 (mm ³)	898	38,384	29,281	9,15
9	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y puntuación Sofa ≤ 11	573	81,164	24,555	6,61
10	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR puntuación Apache ≤ 30	475	31,474	23,661	7,81
11	VR F1+2 ≥ 250 (pmol/l)	508	32,937	28,906	4,08
12	VR proteína C ≤ 40%	610	82,880	26,531	6,30
	VR proteína C > 40%	216	15,179	19,417	-4,24
13	VR AT III < 70%	657	29,552	25,466	4,09
14	VR MP > 10 (nm)	626	30,313	24,837	6,48
15	VR puntuación Apache II ≥ 25	283	86,064	37,500	-1,45
	VR puntuación Apache II < 25	498	24,201	19,545	4,66
	VR puntuación Apache II ≥ 35	51	30,435	39,286	-8,85
	VR puntuación Apache II < 35	671	28,863	25,305	3,56
16	VR Nº de disfunciones orgánicas = 1	187	18,824	12,745	6,08
	VR Nº de disfunciones orgánicas = 2	847	27,273	27,485	-0,21
	VR Nº de disfunciones orgánicas = 3	210	42,727	36,000	6,73
	VR Nº de disfunciones orgánicas = 4	47	25,000	52,632	-29,65

Nº	Grupo	Nº de casos	Tasa de mortalidad del grupo de administración de placebo (a) %	Tasa de mortalidad del grupo de administración de TMD-123 (b) %	Diferencia entre los grupos para de eficacia (a-b) %
	1 ≤ VR Nº de disfunciones orgánicas ≤ 8	744	29,919	25,737	4,18
17	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y 1 ≤ VR Nº de disfunciones orgánicas ≤ 3	596	82,248	24,913	7,33
18	VR lactato en sangre arterial ≤ 6 (mmol/l)	530	26,354	24,901	1,45
	VR lactato en sangre arterial > 6 (mmol/l)	107	61,862	54,717	-2,87
19	VR creatinina plasmática < 2 (mg/dl)	528	26,996	24,528	2,47
	VR creatinina plasmática ≥ 2 (mg/dl)	262	32,847	32,000	0,85
20	Pacientes con diabetes	187	82,990	23,333	9,66
	Pacientes sin diabetes	613	28,247	27,869	0,38
21	Pacientes que usan heparina	416	27,700	28,571	-0,87
	Pacientes que no usan heparina	384	31,250	26,000	6,25
22	VR INR > 1,4, PLT > 80.000 (mm ³) y VR F1.2 ≥ 250 (pmol/l)	408	35,407	27,688	7,77
23	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR proteína C ≤ 40%	410	36,073	26,702	9,37
24	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR AT III < 70%	618	32,714	25,703	7,01
26	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR MP > 10 (nm)	497	33,591	23,950	9,64
26	VR dímero D ≥ 3.500 (ng/ml)	332	29,448	23,669	6,78
27	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR dímero D ≥ 3.500 (ng/ml)	268	31,579	22,968	8,62
28	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR puntuación Apache < 35	524	31,636	24,900	6,74
29	VR F1+2 > 229 (pmol/l)	536	33,088	28,788	4,30
30	VR INR > 1,4, PLT > 30.000 (mm ³) y VR F1+2 > 229 (pmol/l)	428	36,036	27,670	8,37

En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR > 1,4" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR superior a 1,4 en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

5

En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR ≤ 1,4" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR no superior a 1,4 en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR $> 1,4$ y PLT > 30.000 (mm³)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR superior a 1,4 en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia), y un recuento plaquetario superior a 30.000 (mm³) en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR $\leq 1,4$ y/o PLT ≤ 30.000 (mm³)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR no superior a 1,4 en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia), y/o un recuento plaquetario no superior a 30.000 (mm³) en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "TAT ≥ 10 (ng/ml)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor del complejo trombina-antitrombina (TAT) no inferior a 10 ng/ml entre el conjunto de análisis completo.

No es necesario decir que "TAT" mencionado en la tabla mencionada anteriormente significa un valor medido del complejo trombina-antitrombina (TAT) en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia).

En la tabla mencionada anteriormente, "VR F1+2 ≥ 250 (pmol/l)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor del fragmento de protrombina 1+2 (F1+2) no inferior a 250 pmol/l inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR F1+2 > 229 (pmol/l)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor del fragmento de protrombina 1+2 (F1+2) superior a 229 pmol/l inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

"VR AT III $< 70\%$ " significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de antitrombina III (ATIII) inferior a 70% inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR MP > 10 (nm)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de micropartículas superior a 10 nm inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR proteína C $\leq 40\%$ " significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de proteína C no superior al 40% en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR proteína C $> 40\%$ " significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de proteína C superior al 40% en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR puntuación APACHE II ≥ 25 " significa un grupo de pacientes que mostraron una puntuación APACHE II no inferior a 25 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR puntuación APACHE II < 25 " significa un grupo de pacientes que mostraron una puntuación APACHE II menor de 25 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR puntuación APACHE II ≥ 35 " significa un grupo de pacientes que mostraron una puntuación APACHE II no inferior a 35 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR puntuación APACHE II < 35 " significa un grupo de pacientes que mostraron una puntuación APACHE II inferior a 35 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR N° de disfunciones orgánicas" significa el número de disfunciones orgánicas de un paciente entre el conjunto completo de análisis en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia).

En la tabla mencionada anteriormente, " $1 \leq$ VR N° de disfunciones orgánicas ≤ 3 " significa un grupo de pacientes que mostraron un número de disfunciones orgánicas no inferior a 1 y no superior 3 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR $> 1,4$, PLT > 30.000 (mm³) y " $1 \leq$ VR N° de disfunciones orgánicas ≤ 3 " significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR superior a 1,4 en un punto temporal inmediatamente

anterior a la administración (valor de referencia), un recuento plaquetario superior a 30.000 (mm³) en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia), y un número de disfunciones orgánicas no inferior a 1 y no superior a 3 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

5 En la tabla mencionada anteriormente, "VR lactato en sangre arterial ≤ 6 (mmol/l)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de lactato en sangre arterial no superior a 6 mmol/l inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

10 En la tabla mencionada anteriormente, "VR lactato en sangre arterial > 6 (mmol/l)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de lactato en sangre arterial superior a 6 mmol/l inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

15 En la tabla mencionada anteriormente, "VR creatinina sérica < 2 (mg/dl)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de creatinina sérica inferior a 2 mg/dl inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

20 En la tabla mencionada anteriormente, "VR creatinina sérica ≥ 2 (mg/dl)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de creatinina sérica no inferior a 2 mg/dl inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

25 En la tabla mencionada anteriormente, "pacientes con diabetes" significa un grupo de pacientes que estaban complicados por diabetes inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

En la tabla mencionada anteriormente, "pacientes no diabetes" significa un grupo de pacientes que no estaban complicados por diabetes inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

30 En la tabla mencionada anteriormente, "pacientes que usan heparina" significa un grupo de pacientes que usaron heparina a una dosis baja inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

35 En la tabla mencionada anteriormente, "pacientes que no usan heparina" significa un grupo de pacientes que no usaron heparina a una dosis baja inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

40 En la tabla mencionada anteriormente, "cuatro o más veces de administración" significa un grupo de pacientes que recibieron 4 o más veces (es decir, de 4 a 6 veces) la administración de un fármaco en investigación (TMD-123 o placebo) entre el conjunto de análisis completo.

No habrá necesidad de explicar que las "4 o más veces de administración" mencionadas en la tabla mencionada anteriormente significan "administración a lo largo de al menos 4 días consecutivos".

45 En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR $> 1,4$ y 4 o más veces de administración" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR superior a 1,4 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia), y recibieron 4 o más veces (es decir, de 4 a 6 veces) la administración de un fármaco en investigación (TMD-123 o placebo) entre el conjunto de análisis completo.

50 En la tabla mencionada anteriormente, "VR INR $> 1,4$, 4 o más veces de administración y PLT > 30.000 (mm³)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de INR superior a 1,4 en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia), recibieron 4 o más veces (es decir, de 4 a 6 veces) la administración de un fármaco en investigación (TMD-123 o placebo), y mostraron un recuento plaquetario superior a 30.000 (mm³) en un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

55 En la tabla mencionada anteriormente, "VR dímero D ≥ 3.500 (ng/ml)" significa un grupo de pacientes que mostraron un valor de dímero D no inferior a 3.500 ng/ml inmediatamente antes de la administración (valor de referencia) entre el conjunto de análisis completo.

60 En cuanto a "VR INR $> 1,4$ y PLT > 30.000 (mm³)" mencionado anteriormente (634 casos), en la tabla siguiente (tabla 2), se resumen el tiempo desde un punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) hasta la administración por primera vez (columna más a la izquierda de la tabla 2), la eficacia observada para los grupos de pacientes a los que se administró un fármaco en investigación dentro de ese periodo de tiempo (columna más a la derecha de la tabla 2), y similares.

65

[Tabla 2]

Tiempo transcurrido	Grupo de administración de TMD-123		Grupo de administración de placebo		Diferencia entre grupos para eficacia (b-a) %
	Nº de casos	Tasa de mortalidad (a) %	Nº de casos	Tasa de mortalidad (b) %	
No más de 0,5 horas	136	26,471	164	32,927	6,46
No más de 1,0 horas	194	25,258	228	32,456	7,20
No más de 2,0 horas	233	26,609	253	32,411	5,80
No más de 4,0 horas	259	26,255	276	31,159	4,90
No más de 8,0 horas	286	26,224	300	32,000	5,78
No más de 12,0 horas	300	27,000	318	32,390	5,39
No más de 24,0 horas	306	26,797	327	32,110	5,31
Más de 24,0 horas	307	26,710	327	32,110	5,40

En cuanto al conjunto de análisis completo (800 casos), las influencias del lapso de tiempo desde el punto temporal en el que pudo confirmarse que se cumplen los criterios de coagulopatía y los criterios de disfunción orgánica (en el momento de la primera medición) hasta al punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) (en el momento de la nueva medición) dentro de un periodo de 24 horas sobre el valor de INR en plasma de los pacientes se resumen en la tabla siguiente (tabla 3).

[Tabla 3]

Tiempo transcurrido desde la primera medición hasta el punto temporal inmediatamente anterior a la administración	INR en el momento de la primera medición	INR en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración				Total
		No superior a 1,4		Superior a 1,4		Nº de casos
		Nº de casos	%	Nº de casos	%	
0 Hora (solo primera medición)	No superior a 1,4	1	100,0	0	0	1
	Superior a 1,4	0	0	138	100,0	138
No más de 4 horas	No superior a 1,4	1	100,0	0	0	1
	Superior a 1,4	9	15,0	51	85,0	60
Más de 4 horas, pero no más de 6 horas	No superior a 1,4	1	100,0	0	0	1
	Superior a 1,4	19	18,8	82	81,2	101
Más de 6 horas, pero no más de 8 horas	No superior a 1,4	1	100,0	0	0	1
	Superior a 1,4	28	22,4	97	77,6	125
Más de 8 horas, pero no más de 12 horas	Superior a 1,4	39	22,7	133	77,3	172
Más de 12 horas, pero no más de 24 horas	Superior a 1,4	35	19,9	141	80,1	176
Más de 24 horas	Superior a 1,4	12	50,0	12	50,0	24
Total	Superior a 1,4	4	100,0	0	0	4
	No superior a 1,4	142	17,8	654	82,2	796

En cuanto al conjunto de análisis completo (800 casos), las influencias del lapso de tiempo desde el punto temporal en el que pudo confirmarse que se cumplen los criterios de coagulopatía y los criterios de disfunción orgánica (en el momento de la primera medición) hasta el punto temporal inmediatamente anterior a la administración (valor de referencia) (en el momento de la nueva medición) dentro de un periodo de 24 horas sobre el recuento plaquetario de los pacientes se resumen en la tabla siguiente (tabla 4).

[Tabla 4]

Tiempo transcurrido desde la primera medición hasta el punto temporal inmediatamente anterior a la administración	Recuento plaquetario en el punto temporal de la primera medición	Recuento plaquetario en el punto temporal inmediatamente anterior a la administración				Total
		No más de 30.000 (mm³)		Más de 30.000 (mm³)		
		Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos
0 Hora (solo primera medición)	No superior a 30.000 (mm³)	1	100,0	0	0	1
	Superior a 30.000 (mm³)	0	0	122	100,0	122
No más de 12 horas	No superior a 30.000 (mm³)	1	50,0	1	50,0	2
	Superior a 30.000 (mm³)	14	3,0	459	97,0	473
Más de 12 horas, pero no más de 24 horas	No superior a 30.000 (mm³)	0	0	1	100,0	1
	Superior a 30.000 (mm³)	6	3,6	163	96,4	169
Más de 24 horas	Superior a 30.000 (mm³)	2	6,5	29	93,5	31
Total	No superior a 30.000 (mm³)	2	50,0	2	50,0	4
	Superior a 30.000 (mm³)	22	2,8	773	97,2	795

No se observó ningún cambio significativo en el recuento plaquetario dentro del periodo de 24 horas desde el momento de medición del mismo con respecto a la coagulopatía. También se dio a conocer que el 70% o más de los pacientes que mostraron un INR > 1,4 mantuvieron un INR > 1,4 (mantenimiento de la coagulopatía) dentro del periodo de 24 horas posterior a la medición.

Tal como se ha descrito anteriormente, se considera que se prefiere realizar el comienzo de la administración como muy tarde dentro de un periodo de 24 horas después de confirmar que los valores medidos de recuento plaquetario y valor de INR en plasma de los pacientes satisfacen las condiciones mencionadas anteriormente (INR > 1,4 y recuento plaquetario > 30.000 (mm³)) con el fin de obtener una alta eficacia, y los resultados mostrados en las dos tablas anteriores sugieren que, como una de las razones para lo anterior, la coagulopatía se mantendrá, en general, dentro de un periodo de 24 horas.

Además, no hubo ninguna diferencia significativa en la tasa de incidencia de eventos hemorrágicos críticos graves entre los 800 pacientes a los que se administró un fármaco en investigación, y los pacientes que mostraron "VR INR > 1,4 y PLT > 30.000 (mm³)" mencionados anteriormente (634 casos), y tampoco se observó ninguna diferencia significativa con respecto al grupo de placebo.

La puntuación Sofa definida en la presente invención no es una calculada según un procedimiento de cálculo de la puntuación Sofa común, sino una puntuación calculada sobre la base de evaluaciones de cinco órganos internos (órgano respiratorio, órgano circulatorio, hígado, riñón y coagulación) excepto para la evaluación de la escala de coma de Glasgow, y el intervalo de la puntuación es de 0 a 20. Además, como puntuaciones Sofa de órgano respiratorio y de órgano circulatorio, se usaron valores provisionales obtenidos según los criterios siguientes.

Órgano respiratorio: Para pacientes cuyas relaciones P/F no se midieron, la puntuación de un paciente que estaba con gestión de la respiración artificial fue de 3 puntos, y la puntuación de un paciente que no estaba fue de 0 puntos.

Órgano circulatorio: La puntuación de <1> un paciente que cumplió los criterios de selección para el órgano circulatorio establecido en el ensayo clínico fue de 3 puntos, y la puntuación de <2> un paciente al que se administró "dobutamina" o "dopamina no especificada como >5 µg/kg/min" fue de 2 puntos. La puntuación de <3> un paciente que no satisfizo las condiciones de <1> y <2>, pero mostro una presión arterial media inferior a 70 mmHg en el momento de la verificación de competencia fue de 1 punto, y la puntuación de un paciente que no correspondió a ninguno de los pacientes de <1> a <3> fue de 0 puntos.

La puntuación II de APACHE (evaluación de la fisiología aguda y la salud crónica) definida en la presente invención se obtiene de acuerdo con un sistema de puntuación para evaluar la gravedad de la patología de un paciente hospitalizado en una unidad de cuidados intensivos, y se obtiene como un total de puntuaciones dadas según 12 índices fisiológicos, edad y resultados de evaluación sobre enfermedades crónicas complicadas. Se considera que una puntuación más alta indica una gravedad más alta, y el intervalo de la puntuación es de 0 a 71.

Aplicabilidad industrial

El medicamento para su uso según la presente invención que contiene trombomodulina se usa como un medicamento que permite un tratamiento terapéutico eficaz y/o la mejora de la sepsis acompañada de coagulopatía.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un medicamento para su uso en el tratamiento terapéutico y/o la mejora de la sepsis en un paciente, que comprende trombomodulina como principio activo, que se administra al paciente, cuyo valor del complejo trombina-antitrombina (TAT) no es inferior a 10 ng/ml inmediatamente antes de la administración, o cuyo valor de actividad de la proteína C no es superior al 40% inmediatamente antes de la administración.
- 10 2. El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en el que el término inmediatamente antes de la administración significa en un periodo de 24 horas calculado retrospectivamente desde el inicio de la administración de trombomodulina.

Figura 1

Diseño del estudio

