(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 38/17

(11) 공개번호 10-2004-0040489
(43) 공개일자 2004년05월12일

(21) 출원번호 10-2004-7005632
(22) 출원일자 2004년04월16일
번역문 제출일자 2004년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/032625
(87) 국제공개번호 WO 2003/055442
(86) 국제출원출원일자 2002년10월15일
(87) 국제공개일자 2003년07월10일

(30) 우선권주장 60,328,806 2001년10월15일 미국(US)

(71) 출원인 카이론 코포레이션
미합중국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호톤 스트리트 4560

(72) 발명자 크리시알바에이.
미국캘리포니아주94611피드몬트랭돈코트8

(74) 대리인 정진상
박종혁

심사청구 : 없음

(54) 조직 인자 경로 억제제 (ＴＦＰＩ) 의 저용량 투여에 의한패혈증의 치료

요약

조직 인자 경로 억제제(TFPI) 또는 TFPI 유사체를 패혈증 또는 다른 염증 상태로 고통받는 환자들에게 투여를 수반하는 패혈증 또는 패혈 쇼크를 예방 또는 치료하기 위한 방법. 방법은 유해 부작용을 피하기 위해 저용량에서 연속 정맥내 주입의 사용을 포함한다.

대표도

도 1A

색인어

조직 인자 경로 억제제, TFPI, 패혈증, 패혈 쇼크, 정맥내 주입, 비-당화 ala-TFPI, 시토킨, Kunitz 도메인.

명세서

기술분야

본 출원은 참고자료로서 그 전체가 본원에 수록된 2001년 10월 15일자 제출된 임시 출원일련번호 60/328,806의 우선권을 주장한다.

본 발명은 유해 부작용을 최소화하면서 패혈증, 패혈 쇼크, 및 급성 또는 만성 염증의 예방적 처치 및 치료적 처치 방법이다. 보다 구체적으로는, 그것은 패혈증 및 패혈 쇼크와 관련된 증폭된 또는 활성화된 생리학적 경로를 약화시키기 위해 저용량의 조직 인자 경로 억제제 단백질을 투여하는 것을 포함한다.

배경기술

패혈증과 그것의 후유증인 패혈 쇼크는 외과수술후 그리고 위독한 병을 앓고 있는 환자에게서 가장 두려운 합병증 중의 하나로 남아있다. Disease Control Center는 패혈증을 미국에서 13번째의 사망의 주요 원인 [(MMWR,] 1987,39 : 31 and US Dept. of Health and Human Services, 37: 7,1989) 및 노년층 미국인들 사이에서 10번째의 주요한 사망 원인으로 분류하였다(MMWR, 1987,32 : 777 참조). 이들 장애의 발생은 증가하고 있고, 사망률은 높게 남아있다. 패혈증 환자에 대한 간호로 매년 수백만 달러가 소비되는 것으로 추정된다(MMWR, 1987,32 : 777). 사 망은 환자들 중 28% 내지 60%에서 발생할 수 있고, 이러한 퍼센트는 20년 이상동안 어떠한 상당한 개선도 보이지 않았다. 그램양성 및 그램음성 박테리아 감염은 아마도 동일하게 패혈증 및 패혈 쇼크를 초래할 것이다.

패혈증은 감염의 병소로부터 박테리아, 균류, 기생충, 바이러스 및 그들의 생성물(예를 들어, 그램음성 박테리아의 내독소)을 포함하는 다양한 미생물의 확산으로부터 기인하는 독성 상태이다. 패혈증은 패혈증의 형태이고, 보다 구체적으로는 감염의 병소로부터의 박테리아 생성물에 의한 혈류의 침해로부터 기인하는 독성 상태이다. 패혈증은 많은 방식으로 쇼크를 일으킬 수 있고, 일부는 감염의 주요 병소에 관련되고, 일부는 박테리아 내독소의 전신 영향에 관련된다. 예를 들어, 패혈증에서, 박테리아 생성물은 IL-1, IL-6 및 TNF과 같은 전-염증 시토킨과 함께, 응고 시스템을 활성화하고 적혈구 응집을 개시한다. 이러한 과정은 왕성한 전신 염증과 널리퍼진 혈액 응고 또는 혈압의 저하를 포함하는 임상 증상과 관련된 심각한 출혈 및 결국 신장, 심장 및 폐 손상을 초래한다.

패혈 쇼크는 조직에 불충분한 산소 공급, 저혈압 및 감뇨증을 초래하는 불충분한 조직 관혈류가 특징이다. 패혈 쇼크는 박테리아를 포함하는 미생물과 LPS와 같은 그들의 생성물이 직접적으로 면역계 및 응고를 포함하는 다른 숙주 방어 메카니즘 및 차례로 일련의 크로스-토크 메카니즘을 통해 서로를 증폭하는 보체 시스템을 활성화하기 때문에 일어난다. 이들 숙주 방어 메카니즘의 과-증폭은 궁극적으로 세포 손상과 미세혈관구조에서 변경된 혈류를 초래하여 다기관 손상을 초래한다. 미생물은 고전적인 보체 경로를 자주 활성화하고, 내독소는 대안적인 경로를 활성화한다. 보체 활성, 류코트리엔 발생 및 호중성백혈구에 대한 내독소의 직접적인 영향은 폐에서 이들 염증 세포의 축적, 효소의 방출 및 독성 산소 라디칼의 생산을 초래하고 이것은 폐 내피를 손상하고 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 일으킨다. ARDS은 패혈 쇼크를 갖는 환자에서 의 주요 사망 원인이고 폐 울혈, 과립백혈구 응집, 출혈 및 모세관 트롬비가 특징이다.

과도한 응고 또는 심한 출혈이 특징인 전격 파종성 혈관내 응고증(DIC)은 패혈증 환자의 80%이하에서 일어나는 것으로 밝혀졌고 모든 타입의 응고 이상은 보다 흔하다(Levi 등, Thromb. Haemost. 82: 695-705,1999). 응고병증은 결국 다 기관 손상을 초래할 수 있고, 이는 심한 패혈증 환자에서 사망의 주요 즉각적인 원인이다. DIC는 소 혈관에서 섬유소의 널리퍼진 침전이 특징인 침략적인 미생물에 반응하여 일어나는 혈액응고 장애이다. DIC의 개시 원인은 트롬보플라스틴(조직 인자)의 혈중으로의 방출로 보인다. 이 과정 동안에, 섬유소원과 혈소판의 감소가 존재하고, 섬유소 분열 생성물의 상승이 혈관에서 섬유소 침전을 초래한다. 환자는 질병 과정 동안에 응고 프로테아제 억제제의 소진의 정도에 의존하여 혈전증 또는 출혈로 고통받는다. DIC의 일부 일반적인 합병증은 심한 임상 출혈, 혈전증, 조직 국소 빈혈 및 괴사, 용혈 및 기관 손상이다. 응고 연쇄단계의 규제의 일부는 혈류의 속도에 의존한다. DIC와 패혈증에서와 같이 흐름이 감소될때, 문제는 확대된다. DIC(임상적으로 가벼운 것에서 심한 형태까지)는 패혈 쇼크 환자 및 두부 외상 및 화상, 산과 합병증, 수혈 반응 및 암과 같은 다른 몇가지 증후군에서 높은 빈도수로 일어날 것으로 생각된다.

DIC는 다양한 염증 상태와 관련된다. 패혈증 환자에서, DIC와 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)은 7일째까지 가장 예측되는 사망의 변수였다(위험율 4와 2.3)(Martin 등, 1989, Natural History in 1980s, Abstract No. 317, ICAAC Meeting, Dallas). 내피에서 조직 인자의 발현 또는 조직 인자의 혈액에 노출 및 조직인자의 혈중으로의 방출을 포함하는, 패혈증을 초래하는 연쇄단계의 사건은 매우 복합적이다. 다양한 시토킨은 활성화 단핵세포, 내피 세포 및 다른것들로부터 방출된다. 이들 시토킨은 종양 괴사 인자(TNF) 인터류킨 1 (IL-1)(이것은 조직 인자 발현을 상향-조절하는 것으로 알려져있음), 인터류킨 6 (IL-6), 감마 인터페론(IFNγ), 인터류킨 8 (IL-8) 및 다른것들을 포함한다. 보체 연쇄단계는 또한 패혈증 환자의 혈장에서 C3a 및 C5a 수준의 상승에 의해 증명되는 바와 같이 활성화된다.

조직 인자 경로 억제제(TFPI)는 포유류 혈액 혈장에 존재하는 세린 프로타제 저해제이다. Thomas, *Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 26* (1947); Schneider, *Am. J. Physiol. 149,* 123 (1947); Broze amp; Miletich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84* , 1886 (1987). TFPI는 또한 조직 인자 억제제, 조직 트롬보플라스틴 억제제, Factor III 억제제, 외인성 경로 억제제(EPI), 및 지질단백-관련 응고 억제제(LACI)로 알려져있다. 명칭 '조직 인자 경로 억제제(TFPI)'은 1991년 6월 30일에 혈전증 및 지혈에 대한 국제 학회(International Society on Thrombosis and Hemostasis)에 의해 받

아들여졌다.

혈액응고 활성화는 유체인 혈액의 고상의 겔이나 응괴(clot)로의 전환이다. 이에 더하여, 응고 프로테아제의 소비는 과도한 출혈을 가져온다. 주요 사건은 가용성 섬유소원이 불용성 섬유소 가닥으로 전환되는 것이며, 그럼에도 불구하고 섬유소 자체는 총 혈병(blood clot)의 단지 0.15%만을 형성한다. 이 전환은 복잡한 효소 연쇄단계의 마지막 단계이다. 성분(인자)들은 단백질분해효소의 불활성 전구체인 효소원으로 존재하며, 이것이 특이적 부위에서 단백질분해 절단에 의해 활성 효소로 전환된다. 소량의 한 인자의 활성화는 다음번 등등에서 다량의 형성을 촉매함으로써 증폭을 가져오며, 그 결과 섬유소가 극히 빠르게 형성된다.

응고는 내피 바로 밑의 세포에서 발현되는 조직인자(TF)에 인자 VIIa를 노출시키는 혈관 손상에 의해 개시되는 것으로 여겨진다. 인자 VIIa-TF 복합체는 인자 X를 인자 Xa로 절단하고, 인자 IX를 인자 IXa로 절단한다. TFPI는 인자 VIIa와 인자 Xa 둘 다에 결합한다. TFPI, 인자 VIIa(그것의 결합된 TF와 함께), 및 인자 Xa 사이에 형성된 복합체는 지혈을 지속하는데 필요한 인자 Xa 및 IXa의 더 이상의 형성을 억제한다. Broze, Jr., Ann. Rev. Med. 46:103 (1995).

혈류로 직접 도입된 박테리아 내독소에 의한 응고 연쇄단계의 활성화가 동맥 표면에 광범한 섬유소 침착, 뿐만 아니라 섬유소원, 프로트롬빈, 인자 V 및 VIII 및 혈소판의 고갈을 가져올 수 있다. 이에 더하여, 섬유소용해 시스템이 흥분됨으로써 섬유소분해산물이 더 많이 형성된다.

응고 활성화는 외견상 박테리아 산물(예를 들어, 내독소)에 의해 개시되는 것과 동시에, 반대의 메카니즘이 응괴형성(clotting), 즉 섬유소용해 시스템의 활성화에 의해 또한 활성화되는 것 같다. 활성화된 인자 XIII는 플라스미노겐 전-활 성인자를 플라스미노겐 활성인자로 전환하며, 이어서 이 활성인자가 플라스미노겐을 플라스민으로 전환함으로써 응괴 용해를 매개한다. 그러므로, 혈장 섬유소용해 시스템의 활성화는 출혈 경향의 한 원인이 된다.

내독혈증은 조직 플라스미노겐 활성인자 억제제(PAI)의 혈중 수준의 증가와 관련된다. 이 억제제는 조직 플라스미노겐 활성인자(TPA)를 빠르게 불활성화시킴으로써 플라스미노겐의 플라스민으로의 활성화를 통해 섬유소용해를 촉진하는 그것의 능력을 방해한다. 섬유소용해의 손상은 혈관에 섬유소 침착을 일으킬 수 있으며, 따라서 패혈쇼크에 관련된 DIC의 한 원인이 된다.

패혈증 및 관련 응고병증의 예방이나 치료를 위한 만족스러운 시술을 확인하기 위한 노력들이 진행중이다. 응고경로를 가로막는 약제가 중증 패혈 쇼크의 치료적 처치나 예방적 처치로서 반드시 효과적이지는 않다. 예를 들어, 헤파린은 통상 사용되는 항응고제이다. 그러나, 헤파린은 과도한 출혈을 유도하거나 또는 생존 이익의 증거 없이 응고를 약화시킬 수 있기 때문에 사용의 관리가 어렵다. 예를 들어, Aoki 등, 'A Comparative Double-BLIND randomized Trial of Activated Protein C and Unfractionated Heparin in the Treatment of Disseminated Intravascular Coagulation,' Int. J. Hematol. 75, 540-47 (2002) 참조. 몇몇 임상 시험은 DIC의 급작스런 발생이 두드러진 특징인 세균성 내독혈증에서 주로, 헤파린 치료에 의해 패혈증에서 사망률의 감소를 증명하는데 실패했다. 예를 들어, Corrigan 등, 'Heparin Therapy in Septacemia with Disseminated Intravascular Coagulation. Effect on Mortality and Correction of Hemostatic Defects,' N. Engl. J. Med., 283:778-782 (1970); Lasch 등, Heparin Therapy of Diffuse Intravascular Coagulation(DIC)', Thrombos. Diathes. Haemorrh., 33:105 (1974); Straub, 'A Case Against Heparin Therapy of Intravascular Coagulation' Thrombos. Diathes. Haemorrh., 33:107 (1974) 참조.

응고 연쇄단계의 활성화를 약화시키고 염증 반응을 개선하고 결합 내독소를 결합하는 TFPI의 공지된 능력으로 인해, TFPI는 패혈증을 치료하기 위해 유용한 약물로 제안되어 왔다. 재조합 사람 ala-TFPI(TFPI 유사체)의 투여가 패혈증의 동물 모델에서 생존율을 개선하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 미국특허 No. 6,063,764 참조. 내인성 단백질인 TFPI는 꽤 내성이 있다. 정맥내 주입이나 피하 주사에 의한 TFPI 투여는 응괴형성 능력을 감소시키는 것으로 나타났으며, 이는 증가된 프로트로빈 시간(PT)으로서 명백해진다. 동물 및 사람의 연구에서 PT의 연장은 혈장 TFPI의 증가와 선형 관계에 있었다. A. A. Creasey, Sepsis 3:173 (1999).

패혈증의 치사적 효과를 억제하는 동시에 잠재적으로 심각한 부작용을 최소화하는 치료 접근법에 대한 필요성이 본 분야에 여전히 남아 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명의 한가지 구체예는 TFPI 또는 TFPI 유사체를 적어도 약 72 시간의 투여 기간동안 약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율에서 연속 정맥내 주입에 의해, 패혈증을 갖거나 패혈증이 될 위험이 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증의 치료 방법이다.

본 발명의 또다른 구체예는 TFPI 또는 TFPI 유사체를 적어도 약 72 시간의 투여 기간동안 약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율에서 연속 정맥내 주입에 의해, 패혈증에 걸리기 쉬운 또는 패혈증이 의심되는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증의 위험 및 심각성을 감소시키기 위한 예방법이다.

본 발명의 또다른 구체예는 (i)약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율에서 TFPI 또는 TFPI 유사체의 연속 정맥내 주입과 (ii) 항생제, 단일클론 항체, 시토킨 억제제 및 보체 억제제로 구성되는 군으로부터 선택된 추가 약제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증 및 패혈 쇼크를 포함하는 급성 염증을 예방하고 치료하는 방법이다.

본 발명의 또다른 구체예는 TFPI 또는 TFPI 유사체로 구성되는 군으로부터 선택된 약제의 연속 정맥내 주입을 적어도 약 72 시간의 투여 기간동안 약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율에서 환자에게 투여하는 것을 포함하는, DIC와 관련되지 않은 질병의 치료 방법이고 이때 TNF, IL-1, 또는 또다른 시토킨은 조직 인자 발현을 상향 조절한다. 바람직한 구체예에서, 질병 상태는 만성 또는 급성 염증이다. 또다른 바람직한 구체예에서, 상기 환자는 상기 투여 기간동안에 감소되는 IL-6의 혈장 농도를 가진다.

다른 구체예는 상기 TFPI 유사체가 비-당화된 ala-TFPI인, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 유사체가 SEQ ID NO:1의 아미노산 19-89로 구성된 제 1 Kunitz 도메인을 포함하는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 90-160으로 구성된 제 2 Kunitz 도메인을 더 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 유사체가 SEQ ID NO:1의 아미노산 1-160을 포함하거나, 또는 상기 TFPI 유사체가 SEQ ID NO:1의 아미노산 90-160으로 구성된 제 2 Kunitz 도메인을 포함하는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 구체예 중에서 상기 용량율이 약 0.010 내지 약 0.045 mg/kg/hr의 투여 속도에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 어느 구체예를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 용량율은 약 0.025 mg/kg/hr의 투여 속도에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가이다.

다른 구체예는 상기 구체예 중 상기 투여 기간이 적어도 약 96시간인 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 구체예 중에서 상기 투여 속도가 0.024 내지 약 4.8 mg/kg의 총 투여량에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 총 투여량을 제공하도록 투여되는 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 구체예 중에서 상기 투여 속도가 적어도 약 0.006 mg/kg 내지 약 1.2 mg/kg미만의 일일 용량에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 일일 용량을 제공하도록 투여되는 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 또는 상기 TFPI 유사체가 적어도 약 1.2의 기준선 International Normalized Ratio(INR)을 갖는 환자에게 투여되는 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 환자가 적어도 20%까지 기준선 INR을 초과하거나 적어도 약 2.5의 값을 갖는 INR을 가질때 상기 TFPI 또는 상기 TFPI유사체의 투여를 종결하는 것을 더욱 포함하는, 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 환자가 적어도 20의 APACHE II 스코어를 가지는 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 환자가 적어도 약 1000 pg/ml의 기준선 혈장 IL-6 농도를 가지는 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 환자가 쇼크로 고통받고 있는 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 환자가 ARDS로 고통받고 있는 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 환자가 상기 투여 기간동안 증가하는 폐 스코어, ICU 스코어 또는 다 기관 기능장애 스코어를 가지는 상기 구체예 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체가 TFPI 또는 TFPI 유사체를 포함하는 동결건조 조성물로부터 제조되는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체가 아르기닌을 포함하는 조제물로서 투여되는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체가 시트르산염을 포함하는 조제물 로서 투여되는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체가 약 300mM의 아르기닌 염산염과 약 20mM의 시트르산 나트륨을 포함하는 pH 약 5.5의 조제물중에 약 0.15mg/ml의 농도를 가지는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다.

다른 구체예는 24시간의 상기 투여 기간 동안 또는 그 이내에, 항생제, 항체, 내독소 길항제, 항응고 활성을 갖는 조직인자 유사체, 면역자극제, 세포부착 차단제, 헤파린, BPI 단백질, IL-1 길항제, 파파제(PAF 효소 억제제), TNF 억제제, IL-6 억제제 및 보체의 억제제로 구성되는 군에서 선택된 추가 약제를 투여하는 것을 더 포함하는, 상기 구체예들 중 어느 구체예를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 추가 약제는 항체이고, 상기 항체는 TNF, IL-6 및 M-CSF로 구성되는 군에서 선택된 항원에 특이적으로 결합한다.

본 발명의 더 이상의 구체예는 상세한 설명과 함께 하기 참조된 도면에 비추어 분명하다.

도면의 간단한 설명

도 1A와 1B는 생존율에 대한 저용량 ala-TFPI 투여의 효과(1A)와 패혈증성 사람 환자에서 IL-6 수준의 감소(1B)를 보여준다. 도 1A는 0.025 또는 0.05 mg/kg/hr에서 연속 정맥내 주입에 의해 위약 또는 E. coli에서 발현된 재조합 비-당화 ala-TFPI을 수용하는 210명의 패혈증 환자에 대한 Kaplan Meier 생존율 곡선을 보여준다(세부사항은 실시예 5를 참조하라). 결과는 ala-TFPI 치료로 사망률의 감소에 대한 경향을 보여준다. 도 1B는 도 1A에 나타낸 동일한 환자에서 기준선 IL-6 수준의 35%까지의 감소를 위한 시간을 보여준다. 두개의 다른 통계학적 접근을 사용하여 저용량 ala-TFPI 투여는 위약에 비해 IL-6 수준을 상당히 감소시켰다(Mamp;M 및 LOCF; 각각 p = 0.009 및 0.025).

도 2A와 2B는 실시예 5에 기술된 210명의 패혈증 환자에서 트롬빈-안티트롬빈(TATc)의 동역학을 보여준다. 도 2A에서 TATc 수준은 위약 투여는 물론이고 0.025 mg/kg/hr 및 0.050 mg/kg/hr 투여량의 ala-TFPI에 대해 각각 나와 있다. 도 2B는 0.025 mg/kg/hr과 0.050 mg/kg/hr 투여량 양자 대 위약에 대한 조합된 데이타를 보여준다. TATc의 기하학적 평균은 ala-TFPI 투여의 처음 24시간내에 ala-TFPI로 치료된 환자 대 위약로 치료된 환자에서 상당히 낮았다. TATc 수준은 72시간에 걸쳐 계속해서 상당히 더 낮아졌다.

도 3은 건강한 사람 지원자에서 INR과 ala-TFPI('rTFPI')의 혈장 농도 사이의 관계를 보여준다.

발명의 상세한 설명

TFPI 또는 TFPI의 유사체의 연속 저용량 투여(이후에 '저용량 TFPI 투여')는 패혈증의 예방 및 치료에 효과적이지만 더 높은 투여량으로 치료되는 일부 환자에서 발견되는 잠재적으로 해로운 합병증을 상당히 최소화한다. 저용량 TFPI 투여는 적어도 약 0.00025 mg/kg/hr 내지 약 0.050 mg/kg/hr미만의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율에서 TFPI 또는 TFPI의 유사체의 연속 정맥내 주입에 의해 일반적으로 수행된다.

저용량 TFPI 투여는 패혈증 및 패혈 쇼크를 포함하여, 급성 또는 만성 염증 을 억제하거나 약화시킨다. 저용량 TFPI 투여가 적어도 3일동안 계속될때, 패혈증으로 사망할 위험은 감소되지만 유해 부작용으로부터의 합병증, 특히 출혈 장애의 비율은 더 높은 투여량의 TFPI 투여에 비해 최소화된다.

저용량 TFPI 투여의 더 나아간 이점은 충분히 높은 투여량에서, TFPI의 혈장 농도를 감소시킬 수 있는 내성 효과의 회피이다. 내성 효과는 약 850 ng/ml의 혈장 TFPI 농도에서 최대의 절반으로 자극되는 반면, 저용량 TFPI 투여 혈장 수준은 일반적으로 500 ng/ml 아래에 머무른다.

본 발명은 패혈증과 같은 염증성 장애를 치료하는데 있어서 TFPI 및 TFPI의 유사체의 효과와 투여의 더 높은 용량 또는 투여를 위한 대안적인 전략으로부터 초래될 수 있는 유해 부작용의 회피 사이에서 최적 균형을 달성한다. 저용량 TFPI 투여는 또한 파종성 혈관내 응고증(DIC), 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 및 다 기관 손상과 같은 패혈증-관련된 응고 장애의 예방 및 치료에 효과적이다.

TFPI 및 TFPI의 유사체가 적어도 약 0.00025 mg/kg/hr(0.00417 μg/kg/분) 내지 약 0.050 mg/kg/hr(0.833 μg/kg/분) 미만의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율로 주어질때, 패혈증 및 다른 염증성 상태의 치료에서의 효능은 유지되고, 출혈과 같은 유해 부작용은 최소화된다. 최적 조합된 효능 및 안정성을 위해, 용량율은 바람직

하게는 적어도 약 0.010 mg/kg/hr(0.167 μg/kg/분) 내지 약 0.045 mg/kg/hr(0.833 μg/kg/분) 미만의 기준 ala-TFPI의 용량율와 등가하거나, 또는 적어도 약 0.020 mg/kg/hr 내지 약 0.040 mg/kg/hr의 기준 ala-TFPI의 용량율와 등가하고, 가장 바람직하게는 약 0.025 mg/kg/hr(0.417 μg/kg/분)의 기준 ala- TFPI의 용량율와 등가하다. 투여의 경로는 일반적으로는 정맥내 투여이고, 연속 정맥내 주입이 바람직하다. 주입은 적어도 약 72, 96, 120, 또는 240 시간동안 투여될 수 있다. 바람직하게는, 연속 주입은 3 내지 8일동안 투여되고, 보다 바람직하게는 3 내지 6일, 가장 바람직하게는 약 4일동안 투여된다. 투입자에게 연속 주입이란 주입이 상기된 지속기간의 대부분동안 실질적인 중단없이 대략 상기한 속도에서 유지되는 것을 의미한다. 대안으로서는, 간헐적 정맥내 주입이 사용될 수 있다. 간헐적 주입이 사용되면, 그러면 연속 주입에 대해 상기된 용량율와 등가인 시간-평균된 용량율이 사용되어야 한다. 게다가, 간헐적 주입의 프로그램은 주입을 사용하여 얻은 최대 농도보다 약 20% 이하로 더 높은 최대 혈청 농도를 초래해야한다. 환자에서 유해 반응 특히 출혈을 수반하는 부작용을 피하기 위해서, 용량율은 약 0.050 mg/kg/hr에서 기준 ala-TFPI의 연속 정맥내 주입과 등가인 용량율 미만이 되어야 한다.

용량율 및 총 용량을 포함하여, 여기서 기술된 모든 용량은 프로트롬빈 검정법으로 단백질 농도 및 생물학적 활성과 같은 양을 결정하는데 있어서 피할 수 없는 부정확으로 인해 실제로 10% 이하의 편차에 놓이기 된다(하기 참조). 즉, 여기서 언급된 용량보다 10%미만으로 높거나 10% 더 낮은 어떠한 실제적으로 투여된 용량은 거의 언급된 용량이라고 간주된다. 이러한 이유때문에, 모든 용량은 '대략' 특정 용량으로 표현되었다. 예를 들어, '약 0.025 mg/kg/hr'으로 기술된 용량은 0.0225 내지 0.0275 mg/kg/hr범위의 어떠한 실제 용량과 등가인 것으로 간주된다.

TFPI 또는 TFPI의 유사체의 덩어리 주사 또는 대략 더 높은 주입 속도는 또 한 만일 저용량 TFPI 투여 다음이라면 본 발명의 실행에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 덩어리 주사 또는 더 높은 주입 속도는 환자의 혈중에서 투여된 TFPI 또는 TFPI의 유사체의 평형 시간을 줄이는데 사용될 수 있다. 그렇게 하는데 있어서, TFPI의 최후의 정상상태 혈장 수준은 보다 빠르게 도달될 수 있고, TFPI에 대한 수용체는 더욱 빠르게 포화될 수 있다. 2시간동안 약 0.025 mg/kg/hr에서 사람에게 기준 ala-TFPI의 투여는 TFPI(기준 ala-TFPI 플러스)의 혈장 수준을 약 80 ng/ml에서 약 125 ng/ml로 증가시키거나, 또는 대략 50%의 증가시킨다. 동일한 수준은 만일 주입 속도가 증가되거나, 덩어리 주사가 사용되면 더 빠르게 도달될 것이다. 만일 주입이 정상 상태가 얻어질때까지 계속된다면 더 높은 주입 속도는 더 높은 수준을 초래할 것이다. 패혈증을 갖는 환자에서 기준 ala-TFPI의 투여에 대한 정상 상태 수준은 약 0.050 mg/kg/hr에서 약 300 ng/ml이고, 약 0.33 또는 약 0.66 mg/kg/hr에서의 기준 ala-TFPI의 투여에 대해서는 적어도 2μg/ml이다.

단일 연속 주입 또는 분할된 주입 용량으로 숙주에게 투여되는 총 일일 용량은 예를 들어 적어도 약 0.006 mg/kg/일 내지 약 1.2 mg/kg/일 미만의 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 양, 보다 통상적으로는 약 0.24 mg/kg/일 내지 약 1.2 mg/kg/일 미만의 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 양, 그리고 바람직하게는 약 0.6 mg/kg/일의 기준 ala-TFPI와 등가인 양이 될 수 있다. 이러한 범위내에서 더 낮은 양이 예방 또는 다른 목적을 위해 유용할 수 있다. 본 발명의 투여 프로토콜은 또한 환자에게 투여되는 총 용량으로 표현될 수 있다. 총 용량은 주입의 속도와 주입 총 시간의 수학적인 생산물이다. 예를 들어, 기준 ala-TFPI에 대해 약 0.025 mg/kg/hr의 바람직한 용량율 그리고 96시간의 바람직한 주입 시간에서, 총 투여량은 kg 체중 당 약 2.4 mg 기준 ala-TFPI이다. 본 발명에 따라 투여되는 TFPI의 총 용량은 기준 ala-TFPI의 적어도 약 0.75 μg/kg 내지 약 4.8 mg/kg미만과 등가하다. 바람직하게는 총 용량은 적어도 약 1 mg/kg 내지 약 4.8 mg/kg미만의 기준 ala-TFPI과 등가하다. 보다 바람직하게는 총 용량은 약 2.4 mg/kg의 기준 ala-TFPI과 등가하다.

투여량 요법을 조절하는데 사용될 수 있는 한가지 인자는 환자 개인의 응고 기능이며, 이것은 전형적으로 프로트롬빈 시간(PT) 검정법 또는 International Normalized Ratio (INR)를 사용하여 측정된다. INR은 검정법이 국제 기준 트롬보플라스틴 시약에 대해 보정되는 PT 검정법의 표준화이다. 예를 들어 R. S. Riley 등 , J. Clin. Lab. Anal. 14: 101-114 (2000)를 참조하라. 건강한 사람 지원자에서 ala-TFPI에 대한 INR 반응은 나타낸 혈장 농도의 범위에 걸쳐 대략 선형이었다(도 3). INR에서의 전체적인 변화는 혈장 ala-TFPI 농도의 1 μg/ml 증가 당 1.2 유닛이었다. 건강한 지원자와 패혈증 피험자로부터 조합된 데이타에 근거한 약동학 모델에서, ala-TFPI에 대한 INR 반응은 로그 INR이 ala-TFPI 혈장 농도에 선형적으로 관계되는 로그-선형 모델에 의해 가장 잘 기술된다. 반응의 로그-선형 성질은 기준선에서 상승된 INR를 갖는 피험자들(주로 패혈증 피험자들에서 보여짐)이 아마도 유사한 수준의 혈중 ala-TFPI을 갖는 낮은 기준선 값을 갖는 피험자보다 더 큰 응고방해물질 반응을 경험할 것 같다는 것을 의미한다. 더욱이, 농도-반응 곡선의 기울기는 건강한 지원자에서보다 패혈증 피험자에서 더 높게 나타났는데, 이는 심한 패혈증을 갖는 피험자가 ala-TFPI에 대한 강화된 민감성을 가질 수 있다는 것을 암시하고 있다. 그러한 연구에서, 환자 집단에서 ala-TFPI 용량율은 약 0.025 mg/kg/hr에서 기준 ala-TFPI와 등가인 투여량으로부터 약 0.66 mg/kg/hr에서 기준 ala-TFPI와 등가인 투여량까지의 범위였다. 약 0.025에서 또는 약 0.050 mg/kg/hr에서 기준 ala-TFPI와 등가인 용량율을 사용하는 패혈증 환자에서 ala-TFPI의 상 II 연구로부터의 데이타는 기준선 INR이 적어도 1.2인 환자에게서 ala-TFPI에 의해 사망률이 더 크게 감소한다는 것을 지시하였다(하기 표 11 참조). 따라서, 본 발명의 일부 구체예에서, 저용량 TFPI 투여는 저용량 TFPI 투여에 앞서 기준선 INR 이 적어도 1.2, 1.25, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.8, 또는 2.0인 환자에 대해서만 수행된다. 다른 구체예에서, 저 용량 TFPI 투여는 TFPI 투여의 용량율을 낮춤으로써 감소시키거나, 또는 환자의 INR 이 기준점보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 또는 30% 또는 그 이상으로 증가하거나, 또는 환자의 INR 이 적어도 약 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 3.0 또는 3.5 와 같은 위험스러운 높은 수치에 이른다면, 완전히 종료시킨다.

mg/kg/hr에 기초한 용량율 및 총 일일 용량을 포함하는 상기 기술된 투여 요법은 '기준 ala-TFPI의 투여와 등가'의 용량으로 표현된다. 이것은 용량이, 성숙한, (단백질 기준으로) 100% 순수한, 적당하게 폴딩된, 생물학적으로 활성인, 당화되지 않은 ala-TFPI로서 정의된 '기준 ala-TFPI' 의 용량으로 표준화시킴으로써 정량적으로 결정된다는 것을 의미한다. Ala-TFPI 는 TFPI의 유사체이며, 그것의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:2 에 기술된다. 성숙한, 전장 TFPI 및 그것의 유사체를 포함하는 TFPI 의 다른 형태가 또한 본 발명에 사용될 수 있다(하기 참조). Ala-TFPI 를 제외한 TFPI 형태 및 ala-TFPI 의 제제 또는 100% 미만의 순도를 가진 다른 TFPI 유사체로의 본 발명의 실행에 적합한 용량 범위를 측정하기 위해서, 기준 ala-TFPI 에 대한 본원에 기재된 용량 범위는 특정 형태의 TFPI 의 내인성 생물학적 활성에 기초하여 조정될 수 있고, 제제의 생화학적 순도에 기초하여 더욱 조정될 수 있다. TFPI 또는 TFPI 유사체의 내인성 생물학적 활성은, 프로트롬빈 검정으로 정의된 바와 같은, 성숙한, 100% 순수한, 적당하게 폴딩된 TFPI 또는 TFPI 유사체의 고유활성을 지칭하는 것이다. 따라서, 등가의 용량은 (기준 ala-TFPI 용량)/((상대적인 내인성 활성)×(생화학적 순도))로서 계산되고, 이 식에서 상대적인 내인성 활성은 (유사체의 내인성 활성)/(기준 ala-TFPI의 내인성 활성)을 지칭한다. 예를 들어, 특정의 TFPI 유사체가 기준 ala-TFPI 의 80% 의 내인성 생물학적 활성을 가진다면, 특정의 TFPI 유사체에 대한 등가의 용량은 기준 ala-TFPI 에 대한 용량 값을 0.8로 나눔으로써 얻어진다. 더욱이, 환자에게 투여된 조제물이, 예를 들어, 단지 90%만 생화학적으로 순수하다면, 즉, TFPI 의 생물학적 활성이 결여된 10%의 분자종을 포함하는 제제라면, 용량 값을 0.9로 나눔으로써 ala-TFPI 에 대한 기준 용량 값을 추가적으로 수정한다. 따라서, ala-TFPI 의 80%의 내인성 활성을 가지는 가상의 TFPI 유사체의 경우에, 투여시에 90% 생화학적으로 순수하고, 0.025mg/kg/hr로의 기준 ala-TFPI의 투여와 등가의 용량율은 0.0347 mg/kg/hr (즉, 0.025/(0.8 x 0.9))일 것이다.

특정 제제의 등가의 용량은 또한, 상대적인 생물학적 활성을 결정함으로써, 내인성 활성 또는 생화학적 순도를 알지 못하고도 결정될 수 있다. 상대적인 생물학적 활성은 프로트롬빈 시간 검정을 사용하여 TFPI 유사체의 특정의 제제와 TFPI 생물학적 활성 표준을 비교함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, WO 96/40784의 실시예 9의 방법에 따라서 생성된, 약 85-90% 생물학적 활성인 ala-TFPI 분자종을 함유하는 ala-TFPI가 TFPI 생물학적 활성 표준으로 사용될 수 있다. WO96/40784 의 실시예 9의 방법에 따라서 생성된 ala-TFPI 는 프로트롬빈 검정에서 기준 ala-TFPI 의 약 85-90% 활성을 나타낸다. 프로트롬빈 시간 표준 곡선의 플로팅에서, 로그 응고시간은 로그 TFPI 농도에 대해서 플로팅된다. TFPI 생물학적 활성 표준이 기준 ala-TFPI의 85-90% 활성을 가진다면, 플로팅된 활성이 100% 순수한 기준 ala-TFPI 의 활성과 등가가 되도록, 플로팅하기 전에, TFPI 생물학적 활성 표준 농도를 0.85로 곱함으로써, 기준 ala-TFPI 에 대한 활성과 등가인 표준 곡선을 얻을 수 있다. 특정 TFPI 유사체 제제에 대한 응고 시간을 표준 곡선과 비교할 때, 기준 ala-TFPI 의 등가의 농도는 곡선상에서 해독될 수 있다. 대안으로, 표준 곡선의 선형 부분의 경사가 선형 회귀 분석으로 얻어진다면, 기준 ala-TFPI 에 대한 TFPI 생물학적 활성 표준의 활성에 기초하여 경사를 수정할 수 있다. 따라서, 특정 TFPI 유사체 제제의 상대적인 생물학적 활성은 기준 ala-TFPI 활성 대 유사체 제제의 활성의 비율과 일치한다. 예를 들어, 1.00μg의 기준 ala-TFPI 와 동등한 프로트롬빈 시간 활성을 생산하기 위해서 특정 유사체가 1.43μg을 필요로 한다면, 유사체 제제의 상대적인 생물학적 활성은 1.00/1.43 또는, 0.7 이다. 유사체 제조를 위해서, 기준 ala-TFPI 용량과 동등한 용량은 기준 ala-TFPI 용량을 유사체 제제의 상대적인 생물학 적 활성으로 나눔으로써 얻어진다. 예를 들어, 기준 ala-TFPI 에 대한 0.025mg/kg/hr 용량은 유사체 제제의 0.0357mg/kg/hr (즉, 0.025/0.7)과 등가일 것이다.

TFPI 및 TFPI 유사체의 생물학적 활성은 프로트롬빈 검정에 의해서 결정될 수 있다. 적합한 프로트롬빈 검정은 U.S 특허번호 5,888,968 및 WO 96/40784 에 기술된다. 요약하면, 프로트롬빈 시간은 코아규로미터(예를 들어, 오르가논 테크니카제 Coag-A-Mate MTXII)를 사용하여 측정될 수 있다. 적합한 검정 완충액은 1mg/ml 소혈청 알부민을 함유하는, 100 mM NaCl, pH7.5 로 조정된 50mM Tris 이다. 필요한 추가적인 시약은 정상적인 사람 혈장(예를 들어, 오르가논 테크니카에 의한 'Verify 1'), 프로트롬빈 시약(예를 들어, 오르가논 테크니카에 의한 'Simplastin Excel'), 및 TFPI 표준 용액(예를 들어, 검정 완충액의 ml 당 20μg 의 100% 순수한 ala-TFPI(또는 그것의 동량))이다. 예를 들어, 1 내지 5μg/ml 범위의 최종 농도에 대한 TFPI 표준 용액의 일련의 희석액의 응고 시간을 분석함으로써 표준 곡선이 얻어진다. 응괴형성 시간을 측정하기 위해서, 1차적으로 샘플 또는 TFPI 표준을 검정 완충액에서 희석하였다. 그 다음, 정상의 사람 혈장을 부가하였다. 트롬보플라스틴 시약의 첨가에 의해서 응괴형성 반응이 개시되었다. 그 다음, 기구로 응괴형성 시간을 기록한다. 로그 응괴형성 시간 대 로그 TFPI 농도의 플로팅에 의해서 선형 TFPI 표준 곡선을 얻었다. 100% 순수한 표준의 등가의 TFPI 농도에 일치하도록, 표준 곡선을 TFPI 의 순도에 기초하여 조정한다. 예를 들어, 표준이 97% 생화학적으로 순수한(즉, TFPI의 생물학적 활성을 가지지 않는 분자종 3중량%를 함유한다) ala-TFPI 제제라면, 표준의 각 희석액의 농도에 0.97을 곱하여 TFPI 의 실제 농도를 얻는다. 따라서, 97% 순수한 제제의 ml 당 실제 중량에 기초하여 1.0μg/ml 의 TFPI 표준은 1.0 x 0.97, 또는 0.97μg/ml 의 농도에 등가이며, 이 농도로써 처치될 것이다.

본원에 사용될 때, 용어 '패혈증'은 미생물 또는 그들의 생성물의 확산뿐만 아니라, 감염 부위로부터 박테리아 내독소의 확산으로 초래되는 독성 상태를 의미한다.

본원에 사용될 때, 용어 '패혈증-관련 응고 장애'는 박테리아 내독소 또는 미생물 및 그들의 생성물에 의한 응고계 활성으로부터 초래되거나 이와 연관된 장애를 의미한다. 이러한 패혈증-관련 응고 장애의 예는 파종성 혈관내 응고증이다.

일반적으로, TFPI 및 TFPI 유사체는 조직 인자의 상향 조절에 따른 TNF, IL-1 또는 다른 시토카인으로 유도된 TF 활성에 기인하여 발병하는 질병에 유용할 수 있다. 저용량 TFPI 투여는 환자의 IL-6 농도 또는 다른 시토카인 농도를 낮출 수 있다. 저 용량 TFPI 투여는 일반적으로 급성 및 만성 염증을 모두 포함하는, 염증 치료에 유용하다. 저용량 TFPI 에 의해서 치료될 수 있는 염증 상태는 관절염, 패혈성 쇼크, 재관류 손상, 염증성 장질환, (급성 호흡곤란증후군 또는 ARDS를 포함하는) 급성 호흡 질병, 외상 및 화상을 포함한다. 만성 또는 급성 염증의 치료에서, TFPI 및 TFPI 유사체는 항-패혈증법에서와 동일한 양태 및 동일한 용량으로 투여될 수 있다.

TFPI 및 TFPI 유사체는 또한 순환시에 박테리아 내독소의 존재로부터 또는, 미생물과 그들의 생성물의 존재로부터 초래되는 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 상태는 심각한 폐렴 및 다발성 기관 장애뿐만 아니라 균혈증, 복막염, 패혈성 쇼크로 인한 다발성 기관 장애, 및 DIC 를 포함한다.

본원에 사용될 때, 'TFPI' 및 '성숙한, 전장 TFPI'는 모두 276 아미노산 잔기를 함유하는 성숙한 폴리펩티드와, SEQ ID NO:1 에 나타난 그것의 서열 모두를 지칭하는 것이다.

용어 'TFPI 유사체'는 TFPI 분자의 유도체, 즉 변형이 TFPI 의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 아미노산 첨가 또는 치환(일반적으로 천연 상태와 보존적인), 하나 또는 그 이상의 아미노산 결실, 또는 하나 또는 그 이상의 아미노산에 하나 또는 그 이상의 화학적 부분의 부가에 의해서 변형된 사람 TFPI의 전체 276 아미노산 서열을 포함하는 분자(SEQ ID NO:1)를 지칭한다. 폴리펩티드 유사체를 제조하는 방법은 당업계에 공지이고, 하기에서 상세히 기술된다. 바람직한 TFPI 유사체는 N-L-알라닐-TFPI(ala-TFPI)이고, 이것의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:2 에 나타난다. TFPI 유사체는 하기에 기술된 생물활성 검정으로 측정될 때, TFPI 활성의 어떤 기준을 가진다. TFPI 및 유사체에 대한 바람직한 생물활성 검정은 프로트롬빈 시간(PT) 검정이다(상기 참조).

특히 바람직한 TFPI 유사체는 자연계에서 보존성인 치환, 즉 그들의 측쇄에 관련된 아미노산들의 패밀리의 범위안에서 발생하는 치환들을 포함한다. 보다 명확히, 아미노산은 일반적으로 4개 패밀리로 나눠진다: (1) 산성 - 아스파르트산염 및 글루탐산염; (2) 염기성 - 리신, 아르기니, 히스티딘; (3) 비극성 - 알라닌, 발 린, 로이신, 이소로이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 하전되지 않은 극성 - 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌 및 티로신. 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 때로는 방향족 아미노산으로 분류된다. 예를 들어, 로이신을 이소로이신이나 발린으로, 아스파르트산염을 글루탐산염으로, 트레오닌을 세린으로 대체하는 단독 대체, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 대체하는 유사한 보존성 대체가 생물학적 활성에 주요한 효과를 갖지 않을 것이라는 것을 합리적으로 예측할 수 있다. 예를 들어, 관심의 폴리펩티드는 원하는 분자 기능이 그대로 남아 있는 한, 1, 2, 3, 4, 5, 6-50, 15-25, 5-10, 또는 1에서 70까지의 어떤 정수와 같은, 약 1-70개 이하의 보존성 또는 비-보존성 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 당업자는 관심의 분자에서 본원에 정의된 생물학적 활성을 보유하는데 대한 합리적인 가능성을 가지면서 변형될 수 있는 영역을 쉽게 결정할 수 있다.

'상동성'은 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 부분 사이의 유사성 퍼센트로 간주한다. 2개의 폴리펩티드 서열은, 분자들의 한정된 길이에 걸쳐서, 서열들이 적어도 약 50%, 바람직하게 적어도 약 75%, 더 바람직하게 적어도 약 80%-85%, 바람직하게 적어도 약 90%, 가장 바람직하게 적어도 약 95%-98% 서열 상동성, 또는 명시된 범위 사이의 어떤 상동성 퍼센트를 나타낼 때 서로 '실질적으로 상동성'이다. 또한, 본원에 사용된 '실질적으로 상동성'은 명시된 폴리펩티드 서열과 완전한 동일성을 나타내는 서열로 간주한다.

일반적으로, '동일성'은 2개 폴리펩티드 서열에 대해서 각각 정확한 아미노 산-대-아미노산의 일치로 간주한다. 동일성 퍼센트는 서열 정렬에 의해 2개 분자 사이의 서열 정보를 직접 비교하는 단계, 정렬된 두 서열 사이의 일치하는 짝의 정확한 수를 세는 단계, 더 짧은 서열의 길이로 나누는 단계, 및 그 결과에 100을 곱하는 단계에 의해 결정될 수 있다.

바람직하게, 자연 또는 비-자연 발생 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1으로부터 유래된 TFPI와 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상 상동성인 아미노산 서열을 가진다. 더 바람직하게, 이 분자들은 98% 또는 99% 상동성이다. 상동성 퍼센트는 갭 개방 패널티 12와 갭 확장 패널티 2, 그리고 BLOSUM 매트릭스 62를 갖는 어파인 갭 서치(affine gap search)를 사용하는 Smith-Waterman 상동성 조사 알고리듬을 사용하여 결정된다. Smith -Waterman 상동성 조사 알고리듬은 Smith 및 Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482-489 (1981)에 교시된다.

본 발명에 따른 TFPI 및 그것의 단편 및 유사체는 당화되거나 당화되지 않을 수 있다. 성숙한, 전장 사람 TFPI 는 276 아미노산을 가진 혈청 당단백질이고, 분자량은 약 38,000 달톤이다. 이것은 조직인자 활성의 천연 억제제이므로 응고 활성을 나타낸다. U.S.특허번호 5,110,730에 조직인자(TF)가 기재되어 있고, U.S. 특허번호 5,106,833에 TFPI가 기재되어 있다. TFPI cDNA의 클로닝은 Wun 등, U.S. 특허번호 4,966,852에 기재되어 있다. TFPI의 단편 및 유사체는 U.S 특허번호 5,106,833에 기재되어 있다. Ala-TFPI는 또한, 국제 의약명 '티파코긴(tifacogin)'으로 알려진다. Ala-TFPI 는 성숙한, 전장 사람 TFPI와 아미노산 말단에 추가의 알라닌 잔기를 더 가지는 전체 아미노산 서열을 포함한다. Ala-TFPI의 아미노 말단 알라닌 잔기는 E.coli 발현을 개선하고 다르게는 아미노 말단 메티오닌 잔기로 될

수 있는 것을 절단하도록 TFPI 서열로 유전자 조작되어진다. U.S. 특허번호 4,966,852 및 5,212,091을 참조하라. 본 발명의 방법에 사용된 TFPI 및 TFPI 유사체는 세포 또는 조직으로부터 생성될 수 있거나, 또는 원핵생물 또는 진핵생물 세포에서 재조합으로 생성될 수 있다.

성숙한, 전장 TFPI 는 프로테아제 억제제이고 3 Kunitz 도메인을 가지며, 이들 중 2은 인자 VII 및 Xa 와 각각 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 제3의 도메인의 기능은 아직 밝혀지지 않았다. TFPI 는 생체내에서 비활성의 4요소로 된 인자 X_a : TFPI: 인자 VII_a : 조직인자 복합체를 형성함으로써, 응고 개시를 제한하는 기능을 하는 것으로 여겨진다. Rapaport,Blood 73:359-365(1989) 및 Broze 등, Biochemistry 29: 7539-7546 (1990)을 참조하라. TFPI 의 많은 구조적 특징은 다른 상당히 연구된 프로테아제 억제제와의 상동성으로부터 추론될 수 있다. TFPI 는 효소가 아니므로, 화학량적인 방식 즉, TFPI의 Kuntiz 도메인의 하나가 하나의 프로테아제 분자를 저해하는 방식으로 그것의 프로테아제 표적을 저해하는 것으로 추정된다. 바람직하게는, Kunitz 도메인 1 및/또는 2 는 본원발명의 TFPI 분자내에 존재할 것이다. Kunitz 도메인 3의 기능은 잘 알려지지 않았다.

TFPI 및 TFPI 유사체 얻기

본 발명의 방법에 사용된 TFPI 및 TFPI의 유사체는 세포나 조직으로부터 분리 정제되거나, 화학적으로 합성되거나, 또는 원핵세포나 진핵세포에서 재조합적으 로 생성될 수 있다.

Ala-TFPI는 E.coli 숙주 세포를 사용하여, 재조합의 당화되지 않은 단백질로 발현되었다. E.coli 에서 생산된 재조합 단백질을 체외에서 다시 폴딩함으로써 높은 활성의 ala-TFPI 를 생산하는 방법이 기술되어 있다. 예를 들어, WO 96/40784를 참조하라.

TFPI는 또한 Day 등, Blood 76: 1538-1545 (1990)에 기술된 마우스 C127 세포, Pedersen 등, J. Biol Chem. 265: 16786-16793(1990)에서 보고된 갓 태어난 햄스터 신장 세포, 차이니스 햄스터 난소 세포 및 사람 SK 간종양 세포를 포함하는 동물 세포 숙주를 사용하여 재조합 당화된 단백질로서 발현되었다. C127 TFPI 가 동물 연구에서 사용되었고, 래빗에서 조직 인자-유도된 정맥내 응고 저해(Day 등, 상기참조), 개에서 혈전용해 후의 동맥 재폐쇄의 예방(Haskel 등, Circulation 84: 821-827(1991)), 및 개코원숭이의 E.coli 패혈증 모델에서 사망률의 감소(Creasey 등, J. Clin. Invest. 91: 2850 (1993))에 효과적이라는 것이 밝혀졌다.

TFPI는 수가지 방법으로 분리될 수 있다. 예를 들어, TFPI 를 분비하는 세포는 약 3 내지 4일동안 TNF 로 처치된 노령의 내피 세포 또는 새끼의 내피세포뿐만 아니라, 간세포 또는 간종양 세포를 포함한다. TFPI 는 종래의 방법에 의해서 이러한 세포 배양으로 정제될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 Pedersen 등, 1990, J.의 Biological Chemistry,265:16786-16793, Novotny 등,1989,J.의 Biological Chemistry, 264: 18832-18837, Novotny 등, 1991, Blood, 78: 394-400, Wun 등, 1990, J. of Biological Chemistry, 265; 16096-16101, 및 Broze 등, 1987, PNAS (USA), 84: 1886-1890에 기재된 크로마토그래피 방법을 포함한다. 더욱이, TFPI 는 혈류에 나타내고, 혈액으로부터 정제될 수 있다. Pedersen등, 상기참조. 그러나, 충분한 양의 TFPI 를 얻기 위해서는 다량의 혈액이 요구될 것이다.

TFPI 및 TFPI 유사체는 미국특허 No. 4,966,852에 보여진 대로 재조합적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 원하는 단백질의 cDNA가 원핵생물이나 진핵생물에서의 발현을 위해 플라스미드에 편입될 수 있다. 미국특허 No. 4,847,201는 특이적 DNA 서열로 미생물을 형질전환하고 그들을 발현하기 위한 상세한 설명을 제공한다. 미생물을 사용하여 단백질을 발현하는 것에 대한 상세한 설명을 제공하는 많은 다른 참고자료들이 당업자에게 알려져 있다. Maniatas 등 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press와 같은, 대부분의 참고자료가 미국특허 No. 4,847,201에서 인용된다.

미생물을 형질전환하고 그들을 사용하여 TFPI 및 TFPI 유사체를 발현하는 다양한 기술들을 이용할 수 있다. 다음은 가능한 접근법들에 대한 단순한 예시이다. TFPI DNA 서열이 분리되어 적합한 대조 서열에 연결되어야 한다. TFPI DNA 서열은 미국특허 No. 4,966,852에 나타나며, Boehringer-Mannheim 같은 회사로부터 시중에서 입수할 수 있는 pUNC13 또는 pBR3822와 같은 플라스미드에 편입될 수 있다. 일단 TFPI DNA가 벡터로 삽입되면, 그것은 적합한 숙주에 클로닝될 수 있다. DNA는 미국특허 No. 4,683,202(Mullis) 및 미국특허 No. 4,683,195(Mullis 등)에 나타낸 것들과 같은 기술에 의해 증폭될 수 있다. TFPI cDNA는 간암세포(HepG2 및 SKHep 같은)와 같은 세포를 유도하여 TFPI mRNA를 제조한 후, mRNA를 확인 및 분리하고, 그것을 역으로 변역하여 TFPI의 cDNA를 얻음으로써 얻어질 수 있다. 발현 벡터가 E. coli와 같은 숙주로 형질전환된 후, 이 박테리아가 발효되고, 단백질이 발현될 수 있다. 박테리아가 바람직한 원핵 미생물이며, E. coli가 특히 바람직하다. 본 발명에 유용한 바람직한 미생물은 부다페스트 조약하에 1984년 2월 14일자로 ATCC에 기탁된 E. coli K-12, 균주 MM294이다. 그것은 39607의 수탁 번호를 가진다.

다세포 유기체로부터 유래된 진핵 숙주세포 배양물에서 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 발현시키는 것도 물론 가능하다. 예를 들어, Tissue Culture,1973, Cruz 및 Patterson, 편저, Academic Press 참조. 유용한 포유동물의 셀라

인은 쥐 골수종 N51, VERO, HeLa 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, COS, C127, Hep G2, 및 SK Hep를 포함한다. 또한, TFPI 및 TFPI 유사체는 바큘로바이러스-감염된 곤충세포에서 발현될 수 있다(미국특허 No. 4,847,201; 5,348,886; 및 4,745,051 참조). 또한, Pedersen 등, 1990, J. of Biological Chemistry, 265:16786-16793 참조. 진핵세포용 발현 벡터는 보통, 포유동물 세포와 비교할 수 있는 프로모터 및 대조 서열을 포함하는데, 예를 들어 유인원 바이러스 40(SV40)에서 유래된 통상 사용되는 초기 및 후기 프로모터(Fiers, 등, 1978, Nature, 273:113), 또는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 소 유두종 바이러스, 또는 조류 육종 바이러스로부터 유래된 것들과 같은 다른 바이러스 프로모터, 또는 면역글로불린 프로모터 및 열충격 프로모터가 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질전환에 대한 일반적인 양태는 1983년 8월 16일에 발행된 Axel, 미국특허 No. 4,399,216에 의해 설명되었다. 지금은 '인핸서' 영역이 발현을 최적화하는데 중요하다는 것도 밝혀졌는데, 이들 영 역은 일반적으로 프로모터 영역의 상류에서 발견된 서열이다. 필요하다면 복제 기원이 바이러스원으로부터 얻어질 수 있다. 그러나, 염색체로의 통합이 진핵세포에서 DNA를 복제하는 통상적인 메카니즘이다. 식물세포도 이제 숙주로서 이용할 수 있으며, 노팔린 신타제 프로모터 및 폴리아데닐화 신호 서열(Depicker, A., 등, 1982, J. Mol. Appl.Gen. 1:561)과 같은 식물세포와 비교할 수 있는 대조 서열을 이용할 수 있다. 식물세포의 형질전환을 위한 방법 및 벡터가 1985년 11월 7일 공개된 PCT 공보 No. WO 85/04899에 개시되어 있다.

포유동물 세포에서 발현된 TFPI 및 TFPI 유사체의 정제에 사용될 수 있는 방법은 헤파린-Sepharose, MonoQ, MonoS, 및 역상 HPLC 크로마토그래피의 연속적 사용을 포함한다. Pedersen 등, 상동; Novotny 등 1989, J. Biol. Chem. 264:18832-18837; Novotny 등, 1991, Blood, 78:394-400; Wun 등, 1990, 3. Biol. Chem. 265:16096-16101; Broze 등, 1987, PNAS (USA), 84: 1886-1890; 미국특허 No. 5,106,833; 및 미국특허 No. 5,466,783 참조. 이들 참고자료는 포유동물 생성된 TFPI를 정제하는 다양한 방법을 설명한다.

추가적으로, TFPI 및 TFPI 유사체는 박테리아나 효모에서 생성된 후 정제될 수 있다. 일반적으로, 미국특허들 No. 5,212,091; 6,063,764; 및 6,103,500 또는 WO 96/40784에 나타낸 과정이 사용될 수 있다. ala-TFPI 및 다른 TFPI 유사체들은 본원에 참고자료로 수록된 WO 96/40784 및 Gustafson 등, Prot. Express. Pur. 5:233 (1994)에 따라서 정제되고 용해되고 다시 폴딩될 수 있다. 예를 들어, WO 96/40784의 실시예 9에 따라 제조되었을 때, 총 단백질의 약 85중량% 내지 90중량% 를 성숙한 알맞게 폴딩된 생물학적으로 활성인 ala-TFPI를 함유하며, 이 중 약 10% 내지 15%가 하나 이상의 산화된 메티오닌 잔기를 갖는 ala-TFPI의 제제가 얻어진다. 이들 산화된 형태는 프로트롬빈 검정에 의해 측정된 유도체화되지 않은 ala-TFPI의 생물학적 활성과 동등한 생물학적 활성을 가지며, 본원에 개시된 발명에서도 활성일 것으로 예상된다. 나머지 물질은 2량체화된 형태, 덩어리진 형태, 및 아세틸화된 형태를 포함하는 다양하게 변형된 형태의 ala-TFPI를 포함한다.

TFPI 및 TFPI 유사체는 상당한 수의 시스테인 잔기를 가질 수 있으며, 미국특허 No. 4,929,700에 나타낸 과정이 TFPI 리폴딩에 관련된다. TFPI와 유사체는 상기 언급된 것들과 같은 다양한 크로마토그래피법에 의해 완충액으로부터 정제될 수 있다. 추가적으로, 미국특허 4,929,700에 나타낸 방법이 사용될 수 있다. 사람에게 투여하는데 적합한 순도 및 활성 수준을 가져오는 모든 방법이 TFPI 및 TFPI 유사체를 정제하는데 사용될 수 있다.

TFPI 또는 TFPI 변이체는 고체상 기술을 사용하는 직접적인 펩티드 합성과 같은, 아미노산 서열을 합성하기 위한 화학 방법을 사용하여 생산될 수 있다. (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154,1963 ; Roberge 등, Science 269, 202-204,1995). 수동 기술 또는 자동화에 의해서 단백질 합성이 실행될 수 있다. 자동화된 합성은 예를 들어, 어플라이드 바이오시스템 431A 펩티드 합성기(Perkin Elmer)를 사용하여 이루어질 수 있다. 선택적으로, TFPI 의 단편 또는 TFPI 변이체는 별개로 합성될 수 있으며 전장 분자를 생산하도록 화학 방법을 사용하여 조합될 수 있다.

조제물

본 발명에 따르면 TFPI 및 TFPI 유사체의 조제물은 정맥내 주입에 의해 투여된다. 본질적으로 연속 정맥내 주입이 바람직하다. 이 투여를 달성하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 주입은 중추라인(바람직함) 또는 말초라인을 통해 수행될 수 있다. 용량율의 큰 변동은 피해야 하지만, 투여된 TFPI의 결과의 혈장 수준이, 본 발명의 바람직한 구체예에 따르는 일정한 용량율로의 연속 주입으로부터 예상되는 것의 20% 이내라면 본 발명의 용량율로부터의 단기적 벗어남은 허용된다.

환자에게 투여하기 전에, 조제성분들이 TFPI 및 TFPI 유사체에 첨가될 수도 있다. 액상 조제물이 바람직하다. TFPI 및 TFPI 유사체는 다른 조제성분들을 사용하여 다른 농도로, TFPI 단백질의 투여 경로, 용해도 및 안정성과 양립가능한 어떤 생리학적으로 적합한 pH로 조제될 수도 있다. 정맥내 주입을 위한 바람직한 조제물은 약 0.6 mg/ml 이하의 ala-TFPI, 300mM 이하의 아르기닌 염산염, 및 pH 5.0-6.0의 시트르산 나트륨 완충액을 포함한다. 아르기닌, NaCl, 수크로스, 및 만니톨과 같은 어떤 용질은 ala-TFPI를 용해하고 및/또는 안정화시키는 역할을 한다. WO 96/40784 참조. 정맥내 주입을 위한 특히 바람직한 조제물은 약 0.15mg/ml의 기준 ala-TFPI, 300mM의 아르기닌 염산염, 및 pH 5.5의 20mM 시트르산 나트륨을 함유한다. TFPI 및 TFPI 유사체는 또한 선택적으로 0.005% 또는 0.01%(w/v) 폴리소르베이트 80(Tween 80)과 함께 pH 5.5-7.2의 150mM NaCl 및 20mM 인산나트륨 또는 다른 완충액중에 약 0.15mg/ml 이하의 농도로 조제될 수 있다. 다른 조제물은 150mM NaCl, 또는 8%(w/v) 수크로스, 또는 4.5%(w/v

) 만니톨을 함유하는 pH 5.5의 10mM 아세트산 나트륨중에 약 0.5mg/ml 이하의 TFPI, 또는 TFPI 유사체를 함유한다. TFPI 및 TFPI 유사체는 또한 고급염을 사용하여 수 mg/ml 이하의 더 높은 농도로 조제될 수 있다. 예를 들면, 한 조제물은 pH 7.0의 500mM NaCl 및 20mM 인산나트륨중에 ala-TFPI를 약 6.7mg/ml 이하로 함유한다.

TFPI 및 TFPI 유사체의 조제성분의 더 이상의 예들은 오일, 폴리머, 비타민, 탄수화물, 아미노산, 염, 완충액, 알부민, 계면활성제, 또는 벌크화제를 포함한다. 바람직하게, 탄수화물은 단당류, 이당류 또는 다당류와 같은 당 또는 당알콜을 포함한다. 당류 또는 글루칸은 프룩토스, 덱스트로스, 락토스, 글루코스, 만노스, 크실로스, 말토스, 수크로스, 덱스트란, 풀룰란, 덱스트린, 알파 및 베타 시클로덱스트린, 용해성 전분, 히드록시에틸 전분 및 카르복시메틸셀룰루스 또는 그들의 혼합물을 포함할 수 있다. 수크로스가 가장 바람직하다. 당알콜은 OH기를 갖는 C_4 내지 C_8 탄화수소로 정의되며, 갈락티톨, 이노시톨, 만니톨, 크실리톨, 솔비톨, 글리세롤 및 아라비톨을 포함한다. 만니톨이 가장 바람직하다. 상기한 이들 당 및 당알콜은 개별적으로 또는 조합하여 사용될 수도 있다. 당 또는 당알콜은 수성 제제에 용해성인 한 사용량에 고정된 제한은 없다. 바람직하게, 당 또는 당알콜의 농도는 1.0w/v% 내지 7.0w/v%이며, 더 바람직하게는 2.0 내지 6.0w/v%이다. 바람직하게, 아미노산은 카르니틴, 아르기닌, 및 베타인의 좌선성(L) 형태를 포함한다. 그러나, 다른 아미노산이 첨가될 수도 있다. 바람직한 폴리머는 평균분자량이 2,000 내지 3,000인 폴리비닐피롤리돈(PVP) 또는 평균분자량이 3,000 내지 5,000인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 동결건조 전에 또는 복원 후에 용액의 pH 변화를 최소화하기 위해서 조성물에 완충액을 사용하는 것이 또한 바람직하다. 대부분의 어떤 생리학적 완충액도 사용될 수 있으나, 시트르산염, 인산염, 숙신산염, 및 글루탐산염 완충액 또는 그들의 혼합물이 바람직하다. 바람직하게, 완충액의 농도는 0.01 내지 0.3molar이다. 조제물에 사용될 수 있는 계면활성제는 EP No. 270,799 및 268,110에 나타나 있다.

추가로, TFPI 및 TFPI 유사체는, 예를 들어 그것의 혈중 반감기를 증가시키기 위해, 중합체와의 공유 콘쥬게이트에 의해서 화학적으로 변형될 수 있다. 그들을 펩티드에 부착시키기 위한 바람직한 중합체와 방법은 미국특허 No. 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285, 및 4,609,546에 교시되어 있다. 바람직한 중합체는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. PEG는 실온에서 수용성이며, 일반식: $R(O--CH_2--CH_2)_n--O--R$를 가지고, 여기서 R은 수소이거나, 또는 알킬 또는 알칸올기 같은 보호기가 될 수 있다. 바람직하게, 보호기는 1 내지 8개 탄소를 가지며, 더 구체적으로 그것은 메틸이다. 기호 n은 양의 정수이고, 바람직하게 1 내지 1,000, 더 바람직하게는 2 내지 500이다. PEG는 1000 내지 40,000, 더 바람직하게는 2000 내지 20,000, 가장 바람직하게는 3,000 내지 12,000의 평균 분자량을 가진다. 바람직하게, PEG는 적어도 하나의 히드록시기를 가지며, 더 바람직하게는 말단 히드록시기를 가진다. 이 히드록시기는 억제제상의 유리 아미노기와 반응하도록 바람직하게 활성화된다. 그러나, 반응성기의 형태와 양은 본 발명의 공유 콘쥬 게이트된 PEG/TFPI를 달성하기 위해 다양할 수도 있다.

또한, 수용성 폴리옥시에틸화 폴리올이 본 발명에서 유용하다. 그들은 폴리옥시에틸화 솔비톨, 폴리옥시에틸화 글루코스, 폴리록시에틸화 글리세롤(POG) 등이다. POG가 바람직하다. 한가지 이유는 폴리옥시에틸화 글리세롤의 글리세롤 골격이, 예를 들어 모노-, 디- , 트리글리세리드에서 동물 및 사람에서 자연 발생의 같은 골격이라는 것이다. 그러므로, 이 분기는 신체내에서 반드시 외래 약제로서 보여지지는 않을 것이다. POG는 PEG와 같은 범위의 바람직한 분자량을 갖는다. POG의 구조는 Knauf 등, 1988, J. Bio. Chem. 263:15064-15070에 나타나 있고, POG-단백질 콘쥬게이트에 대한 논의는 미국특허 No. 4,766,106에서 볼 수 있으며, 두 문헌 모두 전문이 참고문헌으로 포함된다.

TFPI 또는 TFPI 유사체는 유일한 활성의 항응고 약제로서 투여될 수 있는 반면에, 그것은 또한 한가지 이상의 추가의 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 추가의 치료제, 예를 들어 항내독소, 단일클론 항체(예를 들면, 내독소-결합 단일클론 항체)와 같은 패혈증 치료에 유용한 항체와 항-TNF 쥐 단일클론 항체와 같은 항-TNF 산물을 포함한다. TFPI 및 TFPI 유사체는 또한 인터류킨-I 수용체 길항제, 살균제/침투성 증가(BPI) 단백질, 면역자극제, PAF 길항제(예를 들어, Pafase, 혈소판 활성화 인자 아세틸히드롤라제)와 같은 항염증 활성을 갖는 화합물 및 세포부착 차단제(예를 들면 GPIIb/IIIa 억제제와 같은 항혈소판제)와 조합될 수 있다. 조합물로서 투여될 때 치료제는 동시에 또는 다른 때에 주어지는 별도의 조성물로서 조제될 수 있고, 또는 치료제는 단일 조성물로서 주어질 수 있다.

TFPI 및 TFPI 유사체는 패혈증을 치료하는데 효과적일 다른 약제와 조합하여 제공될 수 있다. 예를 들어, 다음의 것들, 즉 잠재적인 박테리아 감염을 치료할 수 있는 항생제, 박테리아 세포벽 성분에 대한 단일클론 항체, 패혈증 경로에 수반되는 시토킨과 복합체를 형성할 수 있는 수용체, 만일 패혈증과 관련없는 예방 치료법이 요구된다면 낮은 분자량 헤파린 그리고 일반적으로 시토킨 또는 패혈증 경로에서 그들의 효과를 줄이고 패혈증 또는 폐혈 쇼크를 약화시키는 보체 단백질과 상호작용할 수 있는 어떤 약제나 단백질을 TFPI 또는 TFPI 유사체와 조합하여 투여할 수도 있다.

본 발명에 유용한 항생제는 베타-락탐 고리(페니실린), 글리코시드 결합의 아미노당(아미노글리코시드), 거대고리 락톤 고리(매크로리드), 나프타센카르복사니드의 폴리시클릭 유도체(테트라사이클린), 디클로로아세트산의 니트로벤젠 유도체, 펩티드(바시트라신, 그라미시딘, 및 폴리믹신), 콘쥬게이트 이중결합 시스템을 갖는 큰 고리(폴리엔), 술파닐리드로부터 유래된 설파제(술폰아미드), 5-니트로-2-푸라닐기(니트로푸란), 퀴놀론카르복실산(날리딕스산), 기타 등등의 일반적 부류의 것들을 포함한다. 다른 항생제 및 상기한 특정 항생제들의 더 많은 다양한 것들을 Encyclopedia of Chemical Technology, 3판, Kirk-Othymer(편저), 2권, 782-1036페이지 (1978) 및 3권, 1-78페이지, Zinsser, MicroBiology, 17판 W. Joldik 등(편저) 235-277페이지 (1980), 또는 Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 2

7판, W. B. Saunders Company (1988)에서 볼 수 있다.

TFPI 및 TFPI 유사체와 조합될 수 있는 다른 약제는 E5531와 같은 내독소 길 항제(지질 A 유사체, Asai 등, Biol. Pharm. Bull. 22:432 (1999) 참조), 항응고 활성을 갖는 TF 유사체(예를 들어, Kelley 등, Blood 89:3219 (1997) 및 Lee amp; Kelley, J. Biol. Chem. 273:4149 (1998) 참조), 패혈증 경로에 수반된 시토킨에 관한 단일클론 항체, 예를 들어, IL-6 또는 M-CSF에 관한 이들 단일클론 항체, (Creasey 등 1989년 12월 15일에 출원된 미국출원 No. 07/451,218 참조), 그리고 TNF에 관한 단일클론 항체(Cerami 등, 미국특허 No. 4,603,106 참조), 그 단백질을 생성한 세포로부터 성숙한 TNF 프로호르몬을 절단하는 단백질의 억제제(Kriegler등, 1989년 8월 16일자로 출원된 미국출원 No. 07/395,253 참조), IL-1의 길항제(Haskili 등, 1990년 5월 1일 출원된 미국출원 No. 07/517,276 참조), 인히빈과 같은 IL-6 시토킨 발현의 억제제(Warren 등, 1999년 8월 24일 발행, 미국특허 5,942, 220 참조), 그리고 IL-1와 같은 여러가지 시토킨의 수용체 기제 억제제를 포함한다. 보체에 대한 항체 또는 보체에 대한 단백질 억제제, 예를 들면 CRI, DAF, 및 MCP도 또한 사용될 수 있다.

액체 약학 조성물이 제조된 후에, 그것은 분해를 방지하고 중성을 보존하기 위해 동결건조할 수 있다. 액체 조성물을 동결건조하기 위한 방법은 당업자들에게 공지되어 있다. 사용하기 직전에, 조성물은 추가의 성분들을 포함할 수 있는 무균 희석제(예를 들어, Ringer 용액, 증류수, 또는 무균 염수)와 재구성될 수 있다. 재구성할 때, 조성물은 연속 정맥내 주입에 의해 피험자에게 투여된다.

상기한 바와 같이, TFPI 또는 TFPI 유사체는 DIC가 있거나 없는, 패혈증 또는 패혈 쇼크를 갖는 사람 환자를 예방 또는 치료하는데 유용하다. 일반적으로, 패혈증을 갖는 사람들은 균혈증과 관련된 고열(>38℃) 또는 저체온(<35.5℃), 저혈압, 빠른호흡(>20 호흡/분), 빠른맥(>100 박동/분), 백혈구증가증(>15,000 세포/mm ^{3}) 및 저혈소판증(<100,000 혈소판/mm ^{3})이 특징이다. TFPI 및 TFPI 유사체는 환자가 패혈증으로 의심되자마자 즉, 20% 이상의 섬유소원의 강하 또는 섬유소 분열 생성물 또는 다른 생화학적 변화의 출현, 환자의 체온 상승, 및 패혈증과 관련된 백혈구감소증, 저혈소판증 및 저혈압의 진단을 나타내거나 또는 혈압 강하(저혈압), 체온 상승 또는 저하, 호흡 속도 상승, 백혈구감소증, 저혈소판증 등과 같은 전신 염증 반응을 나타내고, 전신 항-감염 치료법을 보장하는 감염이 의심되자마자 투여되어야 한다. TFPI는 또한 예를 들어 총상 또는 외과적 절개로부터 패혈증의 위험이 있는 환자에게 투여될 수 있다. 패혈증의 위험이 있는 환자는 또한 병원 응급실 또는 집중적인 간호 설비에 허용된 환자 그리고 감염의 병소 또는 전신 염증 반응 증후군(SIRS)을 가지거나 갖는 것으로 의심되는 환자를 포함한다.

본 발명은 이제 특히 유리한 구체예들을 설명하는 하기의 실시예를 참조하여 예시될 것이다. 그러나, 이들 구체예들은 예시이며 어떠한 방식으로도 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안되다는 것을 유념해야 한다.

실시예

실시예 1 . 건강한 사람 피험자에의 ala-TFPI 및 헤파린의 동시투여

E. coli에 발현된 비-당화 ala-TFPI를 헤파린과 함께 건강한 지원자에게 두여하였다. ala-TFPI주입 (약 0.5 mg/kg/hr) 11시간 중 6시간 후에 각각 300 또는 5000 U의 용량으로 IV 주입 또는 피하 주사에 의해 헤파린을 투여하였다. 잠재적으로 내피 결합 부위로부터의 ala-TFPI의 치환으로 인해, 어느 경로에 의해서든 헤파린 투여후 ala-TFPI 수준에서의 일시적인 증가가 관찰되었다. 이 시간동안 PT 및 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 값들은 가변적이었는데, 일반적으로 약간 상승하였다가 ala-TFPI 농도의 변화와 동시에 떨어졌다. 이들 용량의 헤파린은 ala-TFPI와 함께 사용될 때 안전하고 좋은 내성을 나타내었다.

실시예 2 . 고용량의 ala-TFPI로의 사람 패혈증의 치료

14명의 피험자를 중증 패혈증에서의 비-당화 ala-TFPI 요법에 대한 II 단계 임상연구의 일부로서 모집하였다. 중증 패혈증을 갖는 피험자에서 연구는 II 단계, 다-중심, 이중-결합, 무작위, 위약-제어, 2단계 용량-확대, 안전성, 및 허용가능성 연구였다. 1차 목적은 ala-TFPI의 안전성 프로파일을 형가하는 것이었다. 2차 목적은 약동학, 시토카인 및 응고 마커, 다-기관 기능상실 스코어, 및 15 및 28일 생존율을 평가하는 것이었다. 5명의 피험자가 위약에 대해, 5명은 약 0.33 mg/kg/hr의 ala-TFPI 용량율에 대해, 4명은 약 0.66 mg/kg/hr의 용량율에 대해 무작위 선출되었다(양쪽 용량 모두 연속 정맥내 주입에 의함). 연구는 예기된 항 응고(높아진 INR) 및 출혈보다 더 높은 이유로 조속히 종료되었다.

유해 사건(AE)은 어떤 용량으로 약제학적 생성물이 투여된 피험자 또는 임상 조사 피험자에서의 어떤 유해한 의학적 발생으로서 정의되며, 반드시 처치와 인과적 관계를 갖지는 않았다. 따라서, AE는 의약 생성물과 관계된 것으로 생각되든 생각되지 않든, 어떤 불리하고도 의도되지 않은 징후(예를 들어, 이상 검사 소견 을 포함), 증상, 또는 생성물의 사용과 일시적으로 관련된 병이 될 수 있다. 심각한 유해 사건(SAE)는 어떤 용량에서 죽음을 초래하고, 생명에 위협

적이며(즉, 조사자의 견해로 피험자가 발생된 경험으로인해 즉각적인 죽음의 위험에 처했다), 피험자의 입원을 필요로 하거나 또는 연장하고, 지속적 또는 현저한 장애/무능(즉, 사건은 정상적인 생활 기능을 수행하기 위한 사람의 능력에 대한 실절적인 파괴를 야기한다)를 초래하거나, 선천적 기형/출생 결함이거나, 또는 적절한 의학적 판단을 근거로, 피험자를 위태롭게 할 수 있고, 심각한 유해 사건으로서 정의된 다른 결과들 중 하나를 막기 위해 의학적 또는 외과적 시술을 필요로 할 수도 있는 중요한 의학적 사건인, 어떤 유해한 의학적 사건으로 정의된다.

ala-TFPI를 받은 9명의 피험자중 7명이 위약을 받은 5명의 피험자중 한명과 비교하여 출혈을 경험하였다. 덧붙여, 3명의 ala-TFPI 수령자가 주입 활동동안에 현저하게 높아진 INR을 가졌다. 2명의 피험자에서, 주입후 INR의 급속한 감소가 중지되었다. 한명의 피험자에서, 주입을 중단하지 않은 데도 불구하고 INR이 기준선을 회복하였다. INR 수준이 높아진 동안에 출혈 사건은 보고되지 않았다. 패혈증 및 그것과 관계된 합병증으로 인해 출혈이외에 SAE가 가장 흔했다.

위약을 받은 5명의 피험자중 1명, 약 0.33mg/kg/hr의 ala-TFPI를 받은 5명중 5명 그리고 0.66 mg/kg/hr의 ala-TFPI를 받은 4명중 2명이 출혈을 포함한 유해 사건을 경험하였다. 위약군에서 5명중 2명의 피험자(40%), 0.33 mg의 ala-TFPI를 받은 군에서 5명중 4명의 피험자(80%), 및 0.66mg의 ala-TFPI를 받은 군에서 4명 모두 연구 동안에 적어도 하나의 SAE를 경험하였다.

SAE에 대한 요약을 표 1에 나타낸다. 피험자는 하나 이상의 SAE를 경험할 수 있음에 유념하라.

표1. SAE에 대한 요약

[표 1]

신체 계통/COSTART 용어	위약 (n=5)	033mg/kg/hr ala-TFPI (n=5)	0.66 mg/kg/hr ala-TFPI (n=4)
몸 전체로서			
패혈증	0	0	1
쇼크	0	1	2
심장혈관계			
심방세동	0	1	0
출혈	0	1	1
저혈압	1	1	1
소화계			
위창자출혈	0	2	0
혈액 및 림프계			
프로트롬빈 증가	0	1	1
신경계			
뇌 부종	0	0	1
뇌줄기 장애	0	0	1
호흡계			
무기폐	1	0	0
기흉	0	1	0
호흡 장애	0	0	1
비뇨 생식계			
급성 신장 기능상실	0	0	1

출혈을 포함한 4개의 SAE의 전체 및 예상밖의 PT 연장과 관계된 2개의 SAE가 ala-TFPI군에서 발생하였다. 다른 SAE들은 중증 패혈증의 합병증에 의한 것이다.

실시예 3 . 래빗 복막염 모델에서의 저용량 TFPI의 효과

래빗에서의 연구는 실시예 2에 설명된 것들보다 저 용량의 ala-TFPI가 효과적일 수 있음을 가리킨다. 래빗 E. coli 복막염 모델에서 저용량의 비-당화 ala-TFPI를 받은 5개의 다른 군들을 평가하였다. 24시간동안 약 0.5kg/kg 약덩어리 및 약 5 mg/kg/min ala-TFPI 용량의 주입(사람 해당량, 0.8 mg/kg/hr)이 58%의 래빗을 구했기 때문에(표 2), 양성 대군군으로서 역활을 하였다. ala-TFPI 용량 군 및 위약군사이의 생존율 퍼센트의 현저한 차이는 가장 낮은 용량을 제외한 모든 용량들에서 보여지며(표 2), 이들 연구에서 위약-처치된 대조군에서와 동일한 생존율 퍼센트를 보였다(20%).

래빗에 헤모글로빈(40μg/ml), 돼지 뮤신(150μg/ml), 및 생육가능한 E. coli 균주 0.18:KL(1.0±0.5×10 ^{5} CFU/kg), 사람들에서 모든 경우의 E. coli 패혈증에 대해 20% 이상을 야기하는 임상 분리주를 함유하는 현탁물을 복강내로 접종하였다. 복막염 유도 4시간 후에 겐타마이신으로의 처치(5번의 용량에 대해 12시간마다 5mg/kg)를 개시하였다. 4시간 후, 열, 오한, 경미한 혈압 강하의 임상 증상이 전형적으로 나타났다. 그 시점에서, 위약 또는 표 2에 나타난 바와 같이, 약덩어리 용량에 이어 연속 정맥내 주입으로 이루어지는, 6번의 ala-TFPI 용량중 한번의 24시간 주입을 받기 위해 무작위로 선출되었다. 7일 후에도 살아남은 래빗은 생존자라고 생각된다. 이 모델에서 죽음의 원인은 호흡 및 다기관 기능상실이다. 부검에서, 비생존자의 폐는 전체적으로 부었고, 기도는 분홍색의 거품투성이의 수액으로 가득차 있었다. 신장은 출혈되고 충혈되었다. 간은 전형적으로 E. coli로부터 생긴 고름을 포함하였다. 고름은 복강 전체에 존재하였다. 반대로, 7일 생존자는 최소의 폐 충혈의 흔적을 보였다. 작게 산발된 고름이 종종 복강내에 존재하였으나, 다른 고형 기관들(부신, 간 및 비장)은 전체적으로 정상이었다.

표 2. 패혈증 집중 감염 래빗 모델에서의 저용량의 ala-TFPI의 효능

[표 2]

ala-TFPI 용량		% 생존률*	혈중 ala-TFPI 수준 (μg/ml)	사람 등가 용량 (mg/kg/hr)
약덩어리 (mg/kg)	연속 주입 (μg/kg/min)			
0.5	5	58(P=.004)	0.8	0.8
0.05	0.5	36(P=.004)	0.4	0.2
0.05	0.05	66(P=.05)	0.14	0.07
0.0001	0.001	73(P=.007)	<0.002	<0.002
0.00001	0.0001	41(P=0.20)	-	-
0.000001	0.00001	20	-	-
대조군		20	-	-

실시예 4 . 패혈증 사람 환자의 처치에서 저용량 ala-TFPI의 안전성 및 효능

이 실시예는 중증 패혈증 환자에 처치하기 위해 저용량 ala-TFPI 투여의 임상 사용을 설명한다.

위약에 대한 E. coli에서 생성된 비-당화 ala-TFPI 0.025 및 0.05mg/kg/hr의 용량율을 평가하기 위해 중증 패혈증 피험자에서의 II단계 단일 맹 용량 확대 연구를 수행하였다. 210명의 피험자들에 96시간까지 연속 정맥내 주입 (CIV)에 의해 ala-TFPI를 투여하였다(위약: n=69; 약 0.025mg/kg/hr ala-TFPI: n=80; 약 0.05 mg/kg/hr ala-TFPI: n=61). 투여 단계 1은 0.025 mg/kg/hr ala-TFPI의 피험자와 위약군을 포함한다. 투약 단계 2는 0.05 mg/kg/hr ala-TFPI의 피험자와 위약군을 포함한다. 연구는 약 0.025 mg/kg/hr 용량율의 ala-TFPI는 안전하고, 위약에 비해 28일 모든 원인 사망율의 감소 및 몇몇 다 기관 기능장애(MOD) 스코어의 향상에 대한 경향과 관계됨을 가리킨다. MOD 스코어는 표 3에 기재된 채점 기준에 따라 정하였다.

환자는 중증 패혈증 발병 24시간내에 연구 병적에 올랐다. 평가 전체 기간동 안, 환자는 수액 소생술, 혈압상승제, 환기 보조, 비경구적 항균제, 및 적절한 외과적 관리를 포함한 완전히 집중적인 치료 관리를 받았다.

프로토콜은 먼저 다른 군의 환자들이 더 낮은 용량 수준에서 더 높은 용량수준으로 연속적으로 진행하면서 0.025mg/kg/hr 내지 0.1mg/kg/hr의 범위의 ala-TFPI 용량 수준을 받는 것을 필요로한다. 이어서, 피험자는 0.025 mg/kg/hr ala-TFPI 용량 수준에서 시작하여 30의 블록으로 연구 병적에 올랐다. 210명의 피험자가 무작위로 선출되고 투여 단계 1(S1)(위약 [n=39] 및 약 0.025mg/kg/hr ala-TFPI[n=80]) 또는 투여 단계 2(S2)(위약 [n=30] 및 약 0.05mg/kg/hr ala-TFPI [N=61])에 1:2 비율로 (위약 대 ala-TFPI) 주입되고, 4일간까지 위약 또는 ala-TFPI의 연속 정맥내 주입 (CIV)을 받았다.

이 연구에 적합한 피험자는 어느 하나 성별 및 18세 이상의 나이를 갖는 환자로, 사전 동의를 받았으며, 다음의 기준: (1) 감염만을 명확하게 검증할 수 있는, 감염에 대한 임상 증거; (2) 전신성 염증 반응 증후군(SIRS)의 징후(열 (중추, 직장, 겨드랑 또는 고실 온도≥38°C) 또는 체온 저하 (중추 또는 직장 온도≤36°C), 심장 박동> 분당 90, 호흡 속도> 분당 20 또는 $PaC0_2$ (CO_2에 대한 폐포 부분 압력)<32mmHg, 또는 피험자가 인공 호흡기를 착용중이라면, 백혈구 세포수>12,000/mm^3, <4,000mm^3, 또는 >10% 미성숙 밴드 형태들로 이루어지는 SIRS의 징후); (3) 폐 기능 장애($PaO_2/Fi0_2$ 비율(흡입된 0_2 부분에 대한 0_2의 폐포 부분 압력 비율) <250 (또는 폐렴 또는 기타 국소화된 폐병의 존재시 <200), 젖산 산증 또는 증가된 혈장 젖산 농도로 인해서라고 생각되는 대사산증(pH≤7.30 또는 염기 결핍 ≥5.0mEq/L(≥5.0mmol/L), 소변감소증(적합한 수액 소생술의 존재하에서 최소 2 속발시간동안의 소변 배출량 ≤0.5mL/kg/hr(피험자가 만성 투석중이라면 기관 기능장애로서 타당하지 않다)), 약물-유도된 것이라고는 생각되지 않는, 이유가 밝혀지지 않은 저혈소판증(혈소판 수≤100,000세포/mm^3)-이 기준은 저혈소판증, 또는 저혈압을 야기할 수 있는 요법들을 받은 피험자에서는 사용할 수 없다(치료학적 용량을 필요로 하는 혈압 상승제(즉, 적어도 2연속시간동안 90mmHg 초과의 심장수축 혈압을 유지하기 위한 5(μg/kg/min)초과의 도파민 또는 임의 용량의 에피네프린, 노르에피네프린, 또는 페닐에프린)에 의해 입증되는 것과 같은, 기관 기능장애/관류저하(OD)에 대한 적어도 하나의 징후 모두를 만족하였다.

주요한 배제 기준은: (1) 예기된 약물 투여 2시간 내의 무반응 저혈압, (2) 공지되거나 또는 추측되는 심장 내막염, (3) 비제어 출혈; INR > 3, (4) 연구 약물 주입전 12시간 이하의 대수술, (5) 6개월 이내의 두개내 출혈 또는 1개월 이내의 패쇄 머리 외상 또는 뇌중풍 또는 증가된 출혈 위험도로 인한 다른 신경계 장애 상태의 병력, (6) 혈소판 수≤20,000/mm^3, (7) 임신, (8) 중량 > 150kg, (9) 중대한 간 질환(Child Pugh grade C) 및/또는 공지거나 또는 추측되는 식도 정맥류, (10) 확인되고, 임상적으로 명백한 췌장염, (11) 연구에 들어가기전 72시간내의 심폐 정지, (12) 급성 또는 만성 이식 거부의 증거; 2도 또는 3도 화상 > 체표면적의 10%, (13) 항응고제, 항-혈소판 약물 또는 혈전용해제 또는 조직 플라스미노겐 활성제로 의 전신 처치, (14) 일일 헤파린 용량 > 20,000 국제 단위, (15) 연구 등록 30일 내의 신규한 연구 약물 또는 생물제제의 인수증, 또는 (16) 허락된 시간에서의 기계적 환기, 투석 또는 혈액여과, 심장율동전환 또는 어떤 필요한 약물/수액 요법이 거부이다.

두개의 용량 단계들로의 후속의 등록으로 인해, 각각의 활성 용량군은 그것의 위약군과 비교된다. 덧붙여, 데이터는 모든 ala-TFPI 피험자에 대해 모든 위약을 비교하여 표시한다. 0.050 mg/kg/hr 용량에서 관찰된 심각한 유해 사건으로 인해 0.1mg/kg/hr 용량을 연구에서 뺐다.

연구 약물, ala-TFPI는 E. coli에서 발현되고, 표준 크로마토그래피 기술에 의해 정제된 재조합 비-당화 ala-TFPI이다. 연구 약물을 0.3mg/ml의 농도의 무균 ala-TFPI 용액 100 ml를 함유하는 바이알에 채우고 등장성 완충제로 조제하였다. 위약은 희석 완충제로 이루어지고, 포장되고, 연구약물과 동일한 조건하에서 보관되었다. ala-TFPI를 4일간의 기간에 걸쳐서 일정한 속도로 미리정의된 용량 수준으로 주입하였다. 약물주입은 ala-TFPI 또는 위약에 대해 전용의 (중추 또는 말초)정맥 카테터를 통해 수행되었다.

28일 동안 또는 죽을 때까지 환자를 추적하였다. 8일 내내 다 기관 기능장애 스코어(MODS) 및 동시 투약을 수집하였다. 4일 내내 급성 생리학 및 만성 건강 평가(APACHE II) 스코어 및 병원 실험실 INR를 수집하였다. 6일 내내 일상 안전성 실험실 파라미터(전체 빌리루빈, 크레아티닌, 아미노전이효소, 혈청 젖산(기준선만), 미분을 갖는 완전한 혈구수(complete boold count:CBC) 및 혈소판)를 수집하 였다. 각각 4일 및 5일 내내, 연구 실험실 파라미터(트롬빈-항-트롬빈 복합체(TATc), 및 IL-6)]와 같은 특수 시험 및 약동학 샘플을 수집하였다. 임상적으로 지시될 경우, 6일 내내 심전도 (ECG) 및 흉부 x-선을 수집하였다. 유해 사건 들(AE) 및 모든 사망 원인에 대해 환자를 모니터링하였다.

병상 모니터(CoaguCheck Plus, Roche Diagnostics, Nutley, New Jersey)와 정기적으로 병원 실험실에 의해 INR을 측정했다. INR 반응에 대한 효과에 의해 ala-TFPI 동력학 및 활성도를 측정했다. 사용된 또 다른 방법은 트롬빈-항 트롬빈 복합체(TAT_C)의 측정이다. 주입 전(시간 0의 2시간전(즉 -2)) 및 2, 3 및 4일에 TAT_C 샘플을 얻었다. 스크리닝중 6시간 이내, 및 1일(4시간), 2, 3, 및 4일째에 병원성 INR을 얻었다; 주입 전, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간 및 그후 투여중 매 6시간±2시간마다, 용량 종료 직전, 용량 종료 후 4 및 8시간에 병상 INR을 얻었다. INR 상승에 의해 투여 조절 및/또는 용량 중지를 가이드하였다. 예정되지 않은 샘플(용량 감소)은 용량 감소 직전 및 용량 감소 후 4시간에 수집되었다.

재조합 ala-TFPI 혈장 농도를 주입전에(시간 0의 -2시간), 1일(4 및 8시간), 2, 3일째에는 물론이고, 투여의 종료시에 수집하였다. TFPI에 대한 단일클론 및 다클론의 항체를 사용한 확인된 전기화학발광 면역분석법을 사용하여 약동학 샘플을 측정하였다. 단일 클론의 항체는 TFPI의 제 1 Kunitz 도메인에 대해 특이적이다. 결과로서, 분석은 내인성 TFPI 뿐만아니라 재조합형(ala-TFPI)를 측정하였다. 분석 기준 및 질 대조군을 래빗 혈장에서 희석하였다. 래빗 혈장은 면역학적으로 교차-반응 TFPI를 함유하지 않기 때문에, 분석은 사람 혈장중의 내인성 TFPI를 측정할 수 있다. 정량의 하한은 5ng/ml 였다.

제 1의 두개의 용량 단계에서 환자 등록동안, 0.025 mg/kg/hr ala-TFPI 및 위약군에 비교하여 0.05 mg/kg/hr ala-TFPI군에서 출혈을 포함하는 SAE에서의 증가 쪽으로의 경향이 나타났다. 이것은 0.1 mg/kg/hr용량으로의 계획된 연구를 수행할 필요성을 미연에 방지하였다.

28일 모든 원인 사망률의 감소 경향은 위약과 비교하여 0.025 mg/kg/hr ala-TFPI 용량군에서 주목된다. 기호논리학적 회귀 모델링은 기준선 실험실 INR 상호작용 효과에 의해 실질적인 처치의 존재를 지시하며, 더 높은 기준선 INR은 더욱 현저한 ala-TFPI 효과와 관련됨을 지시한다.

표 3. 전체 사망률

[표 3]

	투여 단계 1		**투여 단계 2**		**모두**	
	위약 n=39 [N(%)]	**0.025 mg/kg/hr ala-TFPI n=80 [N(%)]**	**위약 n=30 [N(%)]**	**0.05 mg/kg/hr ala-TFPI n=61 [N(%)]**	**위약 n=69 [N(%)]**	**ala-TFPI n=141 [N(%)]**
28일 모든 원인 사망률:	16(41%)	22(28%)	10(33%)	21(34%)	26(38%)	43(30%)

표 4. 기준선 실험실 INR에 의한 사망률[() 안은 피험자수 N]

[표 4]

소집단	**모든 위약 n=69**	**0.025 mg/kg/hr ala-TFPI n=80**	**0.05 mg/kg/hr ala-TFPI n=61**
28일 모든 원인 사망률:			
모든 피험자들	38% (26/69)	28% (22/80)	34% (21/61)
기준선 실험실 INR≥1.2	42% (20/48)	27% (15/56)	40% (17/42)
기준선 실험실 INR<1.2	29% (6/21)	29% (7/24)	21% (4/19)

변형된 패혈증-관련 기관 손상 평가(SOFA) 스코어를 사용하여 다 기관 기능장애 스코어 (MODS)를 결정했다(표 5 참조). 다음의 SOFA 변형이 이루어졌다. 혈소판 주입을 설명하기 위해 응고 스코어를 변형하였다(표 8의 각주 3 참조). 투석을 설명하기 위해 신장 스코어를 변형하였다(표 8의 각주 4 참조). 복합의 집중적인 치료 단위(ICU) 스코어를 추가했다. ICU 스코어는 폐, 심장 혈관, 및 응고 스코어 (특히 혈소판 수)를 결합시킨다.

표 5. 기관 기능장에의 스코어화: MODS [1]

[표 5]

기관계	실험실 시험/임상 평가	코드 리스트
심장 혈관계	평균 동맥압(mmHg) 혈압상승제 용량 [2]	5 = MAP ≥ 70 4 = MAP < 70 3=도파민≤5μg/kg/분 2=도파민>5μg/kg/분 또는 에피네프린/노르에피네프린< 0.1μg/kg/분 또는 어떤 용량의 페닐에프린 1=도파민>15μg/kg/분 또는 에피네프린/노르에피네프린≥0.1μg/kg/분
폐계	PaO_2/FiO_2 mmHg (kPa)	5= ≥400 (≥53.2) 4= 300-399 (39.9-53.1) 3= 200-299 (26.6-39.8) 2=100-199(호흡 보조와 함께)(13.3-26.5) 1= <100 (호흡 보조와 함께) (<13.3)
중추 신경계	글라스고우 코마 (Glasgow Coma) 스코어	5= 15 4= 13-14 3= 10-12 2= 6-9 1= ≤5
응고계	혈소판, x $10^3/mm^3$	5= ≥150 4= 100-149 3= 50-99 2= 20-49 1= <20
신장 계	혈청 크레아티닌, mg/dl (μmol/L)	5= <1.2 (<110) 4= 1.2-1.9(110-170) 3= 2.0-3.4 (171-299) 2= 3.5-4.9 (300-440) 또는 소변 배출량 < 500 mL/24시간 1= ≥5.0 (≥441) 또는 소변 배출량 < 200mL/24시간
간 계	총 빌리루빈 mg/dl (μmol/L)	5 = <1.2 (<20) 4= 1.2-1.9 (20-32) 3= 2.0-5.9 (33-101) 2= 6.0-11.9 (102-204) 1= ≥12(≥205)

[1] : Vincent JL, Moreno R 등, Intencive Care Medicine. 1996: 22: 7; 707-10로 부터 변형.

[2] : 적어도 1시간동안 주어진 카테콜라민

기준선으로부터의 더 높은 % 변화에 의해 지시된 것과 같이 위약과 비교하여 어느 용량의 ala-TFPI 수용자중의 몇몇 기관 기능장애 스코어에서 포지티브의 경향 을 관찰하였다. 이들 경향은 폐 및 ICU 스코어에 대해 가장 뚜렷하다.

표 6. 기관 기능장애 스코어: 기준선 [1] 으로부터의 평균 % 변화

[표 6]

활성 측정	모든 위약 n=69	0.025 mg/kg/hr ala-TFPI n=80	0.05 mg/kg/hr ala-TFPI n=61	모든 ala-TFPI n=141	p-값 [2]
폐	14%	42%	19%	32%	0.056
심장 혈관	55%	76%	79%	77%	0.22
응고 (혈소판)	7%	12%	10%	11%	0.39
변형된 응고 [3]	19%	17%	10%	14%	0.59
간	-3%	-3%	-5%	-4%	0.85
신장	16%	9%	8%	9%	0.26
변형 신장 [4]	-1%	5%	6%	5%	0.36
CNS	16%	17%	25%	20%	0.67
ICU 스코어 [5]	12%	24%	19%	22%	0.053
변형 ICU 스코어 [6]	15%	26%	19%	23%	0.16
총 MODS	5%	10%	8%	10%	0.16
변형 총 MODS [7]	4%	10%	7%	9%	0.15

[1] 기관 기능장애에 대한 정의를 위해, 표 7 참조.

[2] P-값은 위약 대 모든 ala-TFPI 피험자에 대한 것이다.

[3] 피험자가 혈소판을 받았다면, 변형된 응고 스코어를 1로 설정했다.

[4] 피험자가 투석을 받았다면, 변형된 신장 스코어를 1로 설정했다.

[5] 심장 혈관, 폐 및 응고 스코어의 합.

[6] 심장 혈관, 폐 및 변형된 응고(각주 3 참조) 스코어의 합.

[7] 변형된 신장(각주 4 참조) 및 변형된 응고(각주 3 참조) 스코어의 합.

만약 피험자의 INR이 처치동안 피험자의 기준선보다 20% 이상으로 증가되거나, 또는 피험자의 INR이 2.5 또는 그보다 높으면, ala-TFPI의 투여를 중단하였다. 높아진 INR로 인해 투여 중단의 빈도는 각각의 군에서 낮았다. 이들 데이터는 INR 상승이 중증 패혈증 피험자에서 발생함을 시사한다. 위약과 비교하여 ala-TFPI 처치된 피험자에서의 용량 중단의 약간의 증가에 주목했다.

표 7. INR 증가로 용량 중단을 필요로하는 피험자

[표 7]

	투여 단계 1		투여 단계 2		모두	
활성도 측정	위약 n=39	0.025 mg/kg/hr ala-TFPI	위약 n=30	0.05 mg/kg/hr ala-TFPI	위약 n=69	ala-TFPI n=141

	[N (%)]	n=80 [N (%)]	[N (%)]	n=61 [N (%)]	[N (%)]	[N (%)]
상승된 INR로 인한 용량 중단	5(13%)	11(14%)	1(3%)	8(13%)	6(9%)	19(13%)

위약에 대한 ala-TFPI군에서 AE, 출혈을 포함하는 AE, 전신에 걸친 SAE의 발생에서의 주요한 차이는 없다. 출혈을 포함하는 SAE의 전체 발생수는 낮았다. 0.025 mg/kg/hr ala-TFPI 및 위약을 받은 군과 비교하여 0.05 mg/kg/hr ala-TFPI 군에서 출혈을 포함하는 SAE의 발생수에서 약간의 증가가 있었다. 표 9에 제시된 것과 같이 출혈을 포함하는 SAE의 발생은 또한 <1.2 ('비-상승 INR 피험자')에 대한 기준선 INR(≥1.2('상승 INR 피험자')에 의해 분석되었다.

표 8. 유해 사건들(AE) 및 심각한 유해 사건들(SAE)을 갖는 피험자

[표 8]

	투여 단계 1		투여 단계 2		모두	
다음을 갖는 피험자:	위약 n=39 [N (%)]	0.025 mg/kg/hr ala-TFPI n=80 [N (%)]	위약 n=30 [N (%)]	0.05 mg/kg/hr ala-TFPI n=61 [N (%)]	위약 n=69 [N (%)]	ala-TFPI n=141 [N (%)]
어떤 AE	34 (87%)	70 (88%)	27 (90%)	57 (93%)	61 (88%)	127 (90%)
출혈을 포함하는 어떤 AE	9 (23%)	16 (20%)	10 (33%)	17 (28%)	19 (28%)	33 (23%)
어떤 SAE	25 (64%)	46 (58%)	16 (53%)	37 (61%)	41 (59%)	83 (59%)
출혈을 포함하는 어떤 SAE	2 (5%)	6 (8%)	2 (7%)	7 (11%)	4 (6%)	13 (9%)

표 9. 기준선 INR에 의한 출혈을 포함하는 SAE

[표 9]

INR	모든 위약 n=69 [N (%)]	0.025 mg/kg/hr ala-TFPI n=80 [N (%)]	0.05 mg/kg/hr ala-TFPI n=61 [N (%)]
≥1.2	3/48 (6%)	4/56 (7%)	7/42 (17%)
<1.2	1/21 (5%)	2/24 (8%)	0/19 (0%)

약 0.025 mg/kg/hr ala-TFPI 및 위약과 비교하여 약 0.05 mg/kg/hr ala-TFPI를 받은 '상승 INR' 피험자에서 출혈을 포함하는 SAE의 발생수에서의 증가가 있었다. '비-상승 INR' 피험자의 피험자의 지원자에서, 출혈을 포함하는 SAE의 발생수는 낮았다.

표 10. 출혈 유해 사건을 갖는 피험자 리스트 작성

[표 10]

처치군, 부위-목적 수	유해 사건-출혈(축어적 용어)	경중도	관련된 약물	결과	28일 생존 상태
위약					
환자 1	혈액 구토	중증	없음	회복됨	살아있음
환자 2	GI 출혈	중증	없음	회복됨	죽음
	구토(Coffee Ground)	보통	없음	회목됨	
	직장 출혈	보통	없음	회복됨	
	재발 GI 출혈	증증	없음	회복됨	
0.025 mg/kg/hr ala-TFPI					
없음					
0.05 mg/kg/hr ala-TFPI					
환자 3	상부 위창자 출혈	완화	거의 없음	회복됨	살아있음
0.1 mg/kg/hr ala-TFPI					
환자 4	코출혈	보통	가능	회복됨	죽음
	위창자 출혈	보통	가능	회복됨	
	탁한 혈뇨	보통	아마	지속적	

실시예 5 . 환자 소집단들을 통한 사망률

실시예 4에 설명된 II단계 저-용량 ala-TFPI 연구에서의 환자의 다른 소집단들에 대해 사망률을 분석했다. 결과는 표 13에 요약하였다. 결과는 모든 ala-TFPI 환자들에 대한 모든 위약 환자들을 비교하였다(둘 모두 0.025 및 0.050 mg/kg/hr 용량율).

표 11. 저용량 ala-TFPI로 처치된 패혈증 환자의 소집단들에 걸친 28일 모든 원인 사망률

[표 11]

소집단	모든 위약 n=69	모든 ala-TFPI n=141
APACHE II < 20	17% (4/24)	11% (4/35)
APACHE II ≥ 20	49% (22/45)	37% (39/106)
쇼크 없음	30% (7/23)	18% (9/50)
쇼크	41% (19/46)	37% (34/91)
ARDS 없음	18% (6/33)	22% (13/60)
ARDS	57% (20/35)	37% (30/81)

기준선 IL-6 < 1000 pg/ml	29% (15/52)	27% (27/101)
기준선 IL-6 ≥ 1000 pg/ml	62% (8/13)	41% (16/39)
기준선 검사 INR < 1.2	29% (6/21)	26% (11/43)
기준선 Lab INR ≥ 1.2	42% (20/48)	33% (32/98)

본 발명은 특정 구체예들을 참고로 하여 설명되었다. 그러나, 본 출원은 첨부된 청구항의 진의 및 범위를 벗어남없이 당업자에 의해 이루어질 수 있는 그들 변화 및 대체를 포함한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
TFPI 또는 TFPI 유사체를, 적어도 약 72 시간의 투여 기간동안 약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율로 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율로 연속 정맥내 주입에 의해, 패혈증을 갖거나 패혈증이 될 위험이 있는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증의 치료 방법.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 19-89로 구성되는 제 1 Kunitz 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.
제 3항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 90-160으로 구성되는 제 2 Kunitz 도메인을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 1-160을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 90-160으로 구성되는 제 2 Kunitz 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.
제 1항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.010 내지 약 0.045 mg/kg/hr의 용량율에서의 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.
제 7항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.
제 7항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.025 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.
제 9항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.
제 1항에 있어서, 상기 투여 기간은 적어도 약 96시간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.
제 11항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.
제 11항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.024 내지 약 4.8 mg/kg의 총 투여량에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 총 용량을 제공하도록 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.
제 13항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.
제 11항에 있어서, 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체는 약 0.025 mg/kg/hr 의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율에서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.
제 15항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.
제 1항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.006 mg/kg 내지 약 1.2 mg/kg의 일일 용량에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 일일 용량을 제공하기 위해 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.
제 17항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체는 적어도 약 1.2의 기준선 International Normalized Ratio (INR)을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.
제 19항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.
제 1항에 있어서, 상기 환자가 적어도 20%까지 기준선 INR을 초과하거나 또는 적어도 약 2.5의 값을 갖는 INR을 가질때 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체의 투여를 종결하는 것을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.
제 21항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.
제 1항에 있어서, 상기 환자는 적어도 20의 APACHE II 스코어를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.
제 23항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.
제 1항에 있어서, 상기 환자는 적어도 약 1000 pg/ml의 기준선 혈장 IL-6 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.
제 25항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.
제 1항에 있어서, 상기 환자는 쇼크로 고통받고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.
제 27항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.
제 1항에 있어서, 상기 환자는 ARDS로 고통받고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.
제 29항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.
제 1항에 있어서, 상기 환자는 상기 투여 기간 동안에 증가하는 폐 스코어, ICU 스코어, 또는 다 기관 기능장애 스코어를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.
제 31항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체는 TFPI 또는 TFPI 유사체를 포함하는 동결건조된 조성물로부터 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.
제 33항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체는 아르기닌을 포함하는 조제물로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36.
제 35항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체는 시트르산염을 포함하는 조제물로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38.
제 37항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39.
제 1항에 있어서, 상기 TFPI 또는 TFPI 유사체는 약 300 mM 아르기닌 염산염 및 약 20 mM 시트르산 나트륨을 포함하고 약 5.5의 pH를 가지는 조제물중에 약 0.15 mg/ml의 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40.
제 39항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41.
제 1항에 있어서, 상기 투여 기간의 24시간 동안 또는 그 이내에, 항생제, 항체, 내독소 길항제, 항응고 활성을 갖는 조직인자 유사체, 면역자극제, 세포부착 차단제, 헤파린, BPI 단백질, IL-1 길항제, 파파제(PAF 효소 억제제), TNF 억제제, IL-6 억제제 및 보체의 억제제로 구성되는 군에서 선택된 추가 약제를 투여하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42.
제 41항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.
제 41항에 있어서, 상기 추가 약제는 특이적으로 TNF, IL-6 및 M-CSF으로 구 성되는 군으로부터 선택된 항원에 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.
제 43항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.
TFPI 또는 TFPI 유사체를, 적어도 약 72 시간의 투여 기간동안 약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율로 연속 정맥내 주입에 의해, 패혈증이 되기 쉽거나 패혈증으로 의심되는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 패혈증의 위험 및 심각성을 감소시키기 위한 예방법.

청구항 46.
제 45항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47.
제 45항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 19-89로 구성되는 제 1 Kunitz 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.
제 47항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 90-160으로 구성되는 제 2 Kunitz 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49.
제 45항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 1-160을 포 함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.
제 45항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 SEQ ID NO:1의 아미노산 90-160으로 구성되는 제 2 Kunitz 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.
제 45항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.010 내지 약 0.045 mg/kg/hr의 용량율에서의 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.
제 51항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.
제 51항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.025 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.
제 53항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55.
제 45항에 있어서, 상기 투여 기간은 적어도 약 96시간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.
제 55항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.
제 55항에 있어서, 상기 용량율은 약 0.025 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.
제 57항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.
패혈증 또는 패혈 쇼크를 포함하는 급성 염증을 예방적 처치 및 치료적 처치 방법으로서, 환자에게 (i)약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율로 TFPI 또는 TFPI 유사체의 연속 정맥

내 주입 및 (ii)항생제, 단일클론 항체, 시토킨 억제제 및 보체 억제제로 구성되는 군으로부터 선택된 추가 약제를 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.
제 59항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.
DIC와 연관되지 않고 TNF, IL-1, 또는 또다른 시토킨이 조직 인자를 상향 조절하는 질병 상태의 치료 방법으로서, 적어도 약 72 시간의 투여 기간동안 약 0.00025 내지 약 0.050 mg/kg/hr의 용량율에서 기준 ala-TFPI의 투여와 등가인 용량율로, TFPI 또는 TFPI 유사체로 구성되는 군으로부터 선택된 약제의 연속 정맥내 주입을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62.
제 61항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63.
제 61항에 있어서, 상기 질병 상태는 만성 또는 급성 염증인 것을 특징으로 하는 방법.

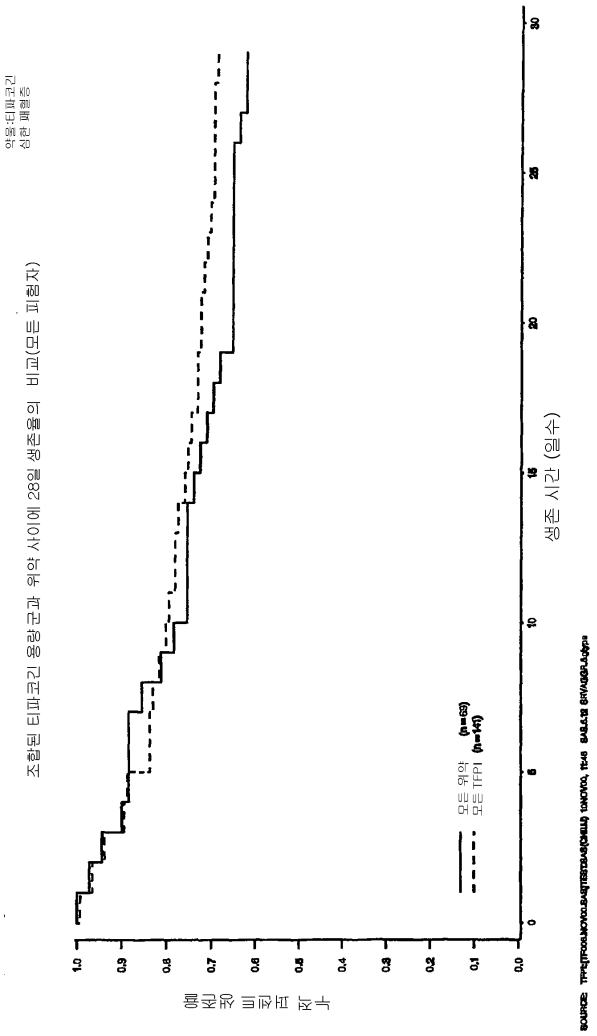
청구항 64.
제 63항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65.
제 61항에 있어서, 상기 환자는 상기 투여 기간동안 감소되는 IL-6의 혈장 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

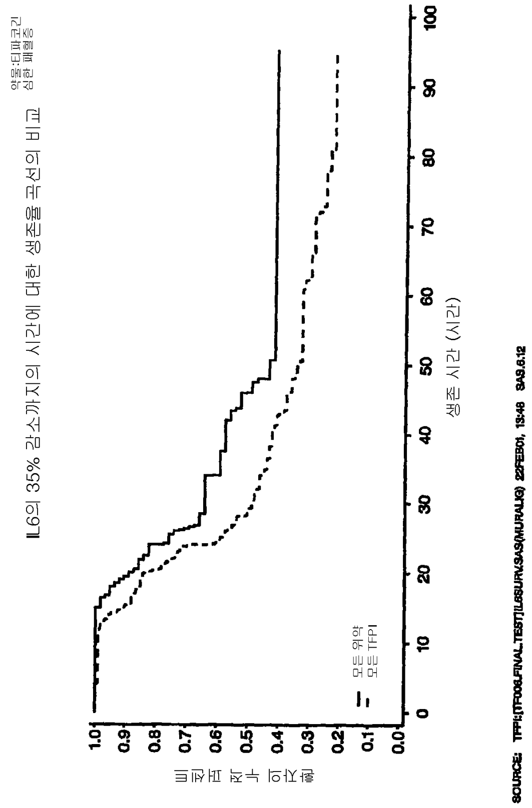
청구항 66.
제 65항에 있어서, 상기 TFPI 유사체는 비-당화 ala-TFPI인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

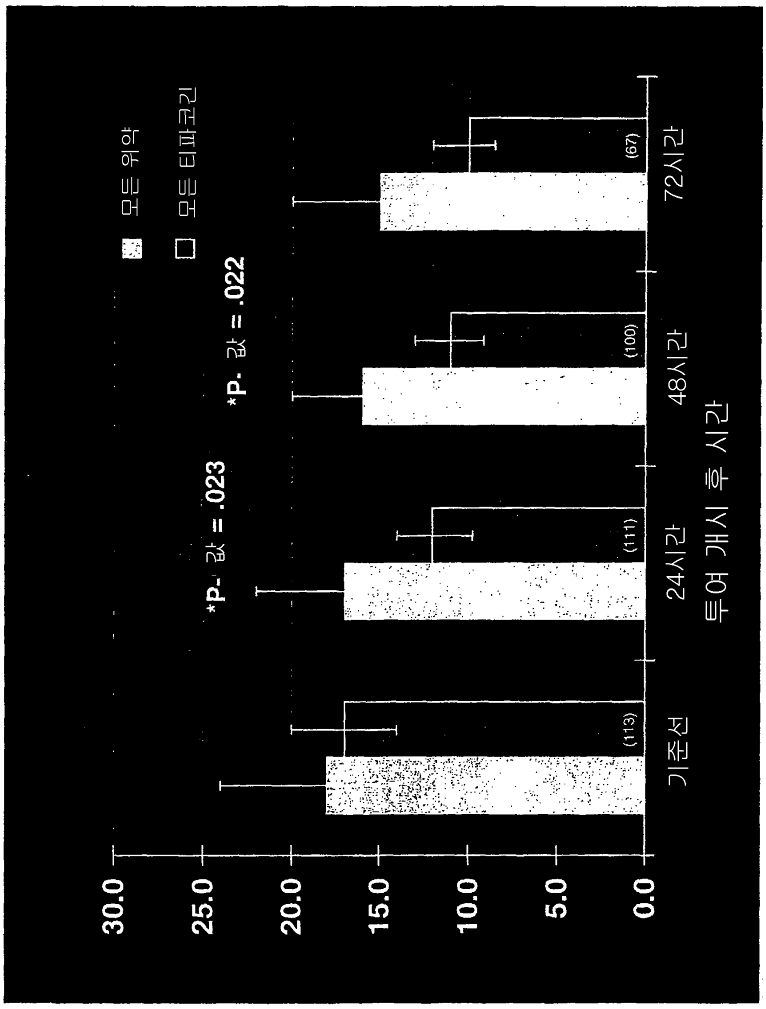
도면1A


조합된 티파코긴 용량군과 위약 사이에 28일 생존율의 비교(모든 피험자)
악물티파코긴
심한 패혈증
누적 퍼센트 생존율
생존 시간 (일수)
모든 위약
모든 TFPI

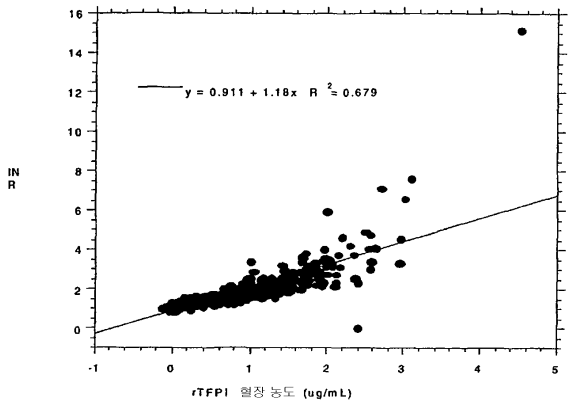
도면1B


IL6의 35% 감소까지의 시간에 대한 생존율 곡선의 비교
모든 위약
모든 TFPI
생존 시간 (시간)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
1.0 0.9 0.8 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 0.0

도면2


모든 위약
모든 티파코긴
*P- 값 = .023
*P- 값 = .022
30.0 25.0 20.0 15.0 10.0 5.0 0.0
(113)
(111)
(100)
(67)
기준선
24시간
48시간
72시간
투여 개시 후 시간

도면3



<110> CHIRON CORPORATION

<120> TREATMENT OF SEPSIS BY LOW DOSE ADMINISTRATION OF TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR (TFPI)

<150> PCT/US60/328,806

<151> 2001-10-15

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 276

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
20 25 30

Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr

35 40 45

Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Thr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
50 55 60

Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
65 70 75 80

Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
85 90 95

Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Thr Ile Thr Arg
100 105 110

Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Thr Gly
115 120 125

Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
130 135 140

Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
145 150 155 160

Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
165 170 175

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Thr Thr Asn
195 200 205

Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Thr Ser Gly Cys Gly Gly
210 215 220

Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
225 230 235 240

Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
245 250 255

Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Thr Glu Glu Ile Phe
260 265 270

Val Lys Asn Met
275

<210> 2
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu
1 5 10 15

Leu Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp
20 25 30

Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe
35 40 45

Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln
50 55 60

Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
65 70 75 80

Asn Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Gln Lys Pro Asp
85 90 95

Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Thr Ile Thr
100 105 110

Arg Thr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr
115 120 125

Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys
130 135 140

Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr
145 150 155 160

Gly Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr
165 170 175

Lys Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr
180 185 190

Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr
195 200 205

Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly
210 215 220

Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys
225 230 235 240

Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr
245 250 255

Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile

260 265 270

Phe Val Lys Asn Met

275