

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506345

(P2005-506345A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 37/64	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/08	A 6 1 K 9/08	4 C O 8 4
A 6 1 K 9/19	A 6 1 K 9/19	4 C O 8 5
A 6 1 K 31/727	A 6 1 K 31/727	4 C O 8 6
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-535710 (P2003-535710)	(71) 出願人	591076811
(86) (22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)		カイロン コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月15日 (2004.4.15)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/032624		08, エミリービル, ホートン ストリー
(87) 国際公開番号	W02003/032904		ト 4560
(87) 国際公開日	平成15年4月24日 (2003.4.24)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/328,806		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成13年10月15日 (2001.10.15)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	クリージー, アブラ エー.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
			11, プレドモント, ランドン コー
			ト 8
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織因子経路インヒビター (TFPI) の投与による重症な肺炎の処置

(57) 【要約】

重症な肺炎を予防的または処置的に処置するための方法は、この状態を罹患する患者またはその状態を発症する危険がある患者への、組織因子経路インヒビター (TFPI) または TFPI アナログの投与を含む。この方法は、TFPI または TFPI アナログの、好ましくは、表面効果を避けるために少ない投薬量での、連続静脈内注入の使用を含む。本発明の1つの実施形態は、重症な肺炎に罹患するか、またはその発症の危険性にある患者に TFPI または TFPI アナログを投与する工程を包含する、重症な肺炎を予防または処置する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重症な肺炎を処置または予防する方法であって、該方法は、以下：

重症な肺炎を有するか、または重症な肺炎を有する危険性のある患者に T F P I または T F P I アナログを投与する工程

を包含する、方法。

【請求項 2】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記患者が実証可能な感染を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I または T F P I アナログが、約 0 . 6 6 m g / k g / 時間未満の投薬率での参照 a l a - T F P I の投与に等しい投薬率で連続静脈内注入によって投与される、方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、ここで前記投薬率が、約 0 . 0 0 0 2 5 ~ 約 0 . 0 5 0 m g / k g / 時間の投薬率での参照 a l a - T F P I の投与に等しく、前記 T F P I または T F P I アナログが、少なくとも約 7 2 時間投与される、方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、ここで前記投薬率が、約 0 . 0 1 0 ~ 約 0 . 0 4 5 m g / k g / 時間の投薬率での参照 a l a - T F P I の投与に等しい、方法。

【請求項 7】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法であって、ここで前記投薬率が、約 0 . 0 2 5 m g / k g / 時間の投薬率での参照 a l a - T F P I の投与に等しい、方法。

【請求項 9】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 T F P I または前記 T F P I アナログが、少なくとも約 9 6 時間投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 T F P I アナログは、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I または T F P I アナログが、約 0 . 0 2 4 ~ 約 4 . 8 m g / k g の合計投薬量での参照 a l a - T F P I の投与に等しい合計投薬量を提供するように、連続静脈内注入によって投与される、方法。

【請求項 13】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 10 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I または T F P I アナログが、約 0 . 0 2 5 m g / k g / 時間の投薬率での参照 a l a - T F P I の投与に等しい投薬率で連続静脈内注入によって投与される、方法。

【請求項 15】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 14 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I または T F P I アナログが、約 0 . 0 0 6 ~ 約 1 . 2 m g / k g の 1 日の投薬量での参照 a l a - T F P I の投与に等しい 1 日の投薬量を提供するように、連続静脈内注入によって投与される、方法。

【請求項 17】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I アナログが、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 ~ 8 9 からなる第一の K u n i t z ドメインを含む、方法。 10

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I アナログが、配列番号 1 のアミノ酸 9 0 ~ 1 6 0 からなる第二の K u n i t z ドメインをさらに含む、方法。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I アナログが、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 1 6 0 を含む、方法。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I アナログが、配列番号 1 のアミノ酸 9 0 ~ 1 6 0 からなる第二の K u n i t z ドメインを含む、方法。 20

【請求項 22】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記 T F P I または T F P I アナログが、T F P I または T F P I アナログを含む凍結乾燥した組成物から調製される、方法。

【請求項 24】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 T F P I または T F P I アナログが、アルギニンを含む処方物として投与される、方法。 30

【請求項 26】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 T F P I または T F P I アナログが、クエン酸塩を含む処方物として投与される、方法。

【請求項 28】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 27 に記載の方法。 40

【請求項 29】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 T F P I または T F P I アナログが、約 3 0 0 m M のアルギニン塩酸塩および約 2 0 m M のクエン酸ナトリウムを含み、かつ p H が約 5 . 5 を有する処方物中で、約 0 . 1 5 m g / m l の濃度を有する、方法。

【請求項 30】

前記 T F P I アナログが、非グリコシル化型 a l a - T F P I である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 T F P I または T F P I アナログの投与と同時に、 50

または該投与の24時間以内に、さらなる薬剤を投与する工程をさらに包含し、該さらなる薬剤が、抗生物質、抗体、エンドトキシンアンタゴニスト、抗凝血活性を有する組織因子アナログ、免疫賦活剤、細胞接着ブロッカー、ヘパリン、BPIタンパク質、IL-1アンタゴニスト、pafアーゼ(PAF酵素インヒビター)、TNFインヒビター、IL-6インヒビターおよび補体のインヒビターからなる群から選択される、方法。

【請求項32】

前記TFPIアナログが、非グリコシル化型ala-TFPIである、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

請求項31に記載の方法であって、ここで前記さらなる薬剤が抗体であり、該抗体は、TNF、IL-6およびM-CSFからなる群から選択される抗原に特異的に結合する、方法。 10

【請求項34】

前記TFPIアナログが、非グリコシル化型ala-TFPIである、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

重症な肺炎を処置するための方法であって、該方法は、以下：

(i) TFPIまたはTFPIアナログおよび(ii)抗生物質、モノクローナル抗体、サイトカインインヒビターおよび補体インヒビターからなる群から選択されるさらなる薬剤を患者に投与する工程を包含する、方法。 20

【請求項36】

前記TFPIアナログが、非グリコシル化型ala-TFPIである、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

請求項35に記載の方法であって、前記患者は実証可能な感染を有している、方法。

【請求項38】

請求項35に記載の方法であって、ここで前記TFPIまたはTFPIアナログが、約0.66mg/kg/時間未満の投薬率での参照ala-TFPIの投与に等しい投薬量で、連続静脈内注入によって投与される、方法。 30

【請求項39】

請求項38に記載の方法であって、ここで前記投薬率が、約0.00025~約0.050mg/kg/時間の投薬率での参照ala-TFPIの投与に等しい、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2001年10月15日に出願された仮出願番号60/328,806に対する優先権を主張し、その全体が、本明細書で参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、重症な肺炎を治療的に処置するための方法に関する。より具体的には、本発明は、重症な肺炎に関連する過増殖の生理学的経路または増幅された生理学的経路を減衰させるための、組織因子経路インヒビタータンパク質の投与に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

肺炎は、肺(肺胞腔および間質組織が挙げられる)の1以上の機能的要素の急性感染から生じる。米国では、毎年約200万人の人々が、肺炎を発生し、そして、これらの人々のうちの40,000~70,000人が死に至る。肺炎は、死因としての全疾患分類のう 50

ちの6番にあたり、最も一般的な致死性の院内（病院でかかる）感染である。市中肺炎（CAP）は、米国において健康医療費に多大な衝撃を有し、これは概算で毎年140億ドルの直接費用および90億ドルの損失賃金を占める（Lynch JP、Martinez FJ、Community-acquired pneumonia、Curr Opin Pulm Med、1998；4：162～172）。発展途上国において、下気道感染は、代表的に、主要な死因であるか、または感染性下痢のみでは第2位のいずれかである（The Merck Manual、Sec. 6、Ch. 73、Pneumonia、2000）。

【0004】

「重症な肺炎」として知られる状態は、種々の機構（American Thoracic Society（ATS）が挙げられる）によって示される指針に従って特徴付けられる（Am J Respir Crit Care Med 2001；163：1730～1754）。例えば、ATSは、重症な肺炎の診断のための他の基準に加えて、少なくとも1つの主要な基準（例えば、機械的換気の必要性または敗血症ショック）を必要とする。一般的に、重症な肺炎は、例えば、炎症または凝固のような要因に起因する、急性肺疾患、肺炎症性疾患、または肺機能における任意の摂動から生じ得る。重症CAPの診断は、特に肺炎のためにICUに収容された患者に基づく。疫学的に、この患者集団は、全ICU収容者の約10%を構成する。肺炎に罹患するICUにいる患者は、CAPに罹患する一般の入院患者についての15%より低い死亡率と比較して、全CAP患者の最も高い死亡率（30%～40%）を有する。

10

20

【0005】

米国においては毎年、市中肺炎（CAP）は、約400万人の成人において診断され、そしてそのうちの600,000人が入院を必要とする。Fineら、N. Engl. J. Med. 336、243～50、1997。全体的に、CAPの発生数は、年齢と共に増加し、そして65歳以上において最も高い有病率が見出される。Marstonら、Arch Intern Med. 1997；157：1709～1718。発生数はまた、共存症（例えば、慢性閉塞性肺疾患、ぜん息、真性糖尿病、アルコール症、免疫抑制、腎不全、慢性肝疾患、および冠動脈疾患）を有する患者において増加する。Marrie、Curr Opin Pulm Med. 1996；2：192～197；Niedermannら、Am Rev Respir Dis. 1993；148：1418～1426。

30

【0006】

肺炎は、米国において感染からの死因では1番目であり、そして全死因の6番目である。肺炎関連死亡率は、1979年～1992年で22%増加し、1992年では、全肺炎関連死の89%が年配（65歳以上）の患者であった。肺炎死亡率およびインフルエンザ死亡率 - 米国、1979～1994 [公開された修正が、MMWR. 1995；44：782において見られる]。MMWR. 1995；44：535～537を参照のこと。Fineおよび共同研究者（1997）は、特定の共存疾患（新生物疾患、うつ血性心不全（CHF）、脳血管疾患、腎疾患、および肝疾患）および特定の理学的検査の所見（変化した精神状態、増加した心拍数、増加した呼吸数、低下した収縮期血圧、および異常低体温または異常高体温）もまた、CAP関連死亡率の増加に関連すると報告した。さらに、CAPは、米国において健康医療費に多大な衝撃を有し、これは概算で毎年140億ドルの直接費用および90億ドルの損失賃金を占める（LynchおよびMartinez、Curr Opin Pulm Med. 1998；4：162～172）。

40

【0007】

組織因子経路インヒビター（TFPI）は、哺乳動物の血漿中に存在するタンパク質であり、そしてセリンプロテアーゼインヒビターである。Thomas、Bull. Johns Hopkins Hosp. 81、26（1947）；Schneider、Am. J. Physiol. 149、123（1947）；BrozeおよびMiletich、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84、1886（1987）。TF

50

PI はまた、組織因子インヒビター、組織トロンボプラスチンインヒビター、第III因子インヒビター、外因性経路インヒビター (EPI)、およびリポタンパク質関連凝固インヒビター (LACI) として公知である。「組織因子経路インヒビター」(TFPI) との名称は、1991年6月30日に、International Society on Thrombosis and Hemostasis によって採択された。

【0008】

血液凝固活性化は、流体血液の固体ゲルまたは凝血塊への転換である。さらに、凝固プロテアーゼの消費は、過剰な出血につながる。フィブリン自体は、全凝血塊の0.15%を形成するに過ぎないが、主要な事象は、溶解性フィブリノーゲンの不溶性フィブリン鎖への転換である。この転換は、複雑な酵素カスケードにおける最終段階である。この成分 (因子) は、チモゲン (タンパク質分解酵素の不活性前駆体) として存在し、これらは、特定の部位でのタンパク質分解切断によって活性酵素に転換される。少量の1つの因子の活性化は、次の因子のより多量の形成などを触媒し、極度に迅速なフィブリンの形成を生じる増幅を生じる。

10

【0009】

凝固は、第VIIa因子を組織因子 (TF) に曝す脈管損傷によって開始されると考えられ、これは、内皮の下で細胞上で発現される。第VIIa因子-TF複合体は、第X因子を第Xa因子へと切断し、そして第IX因子を第IXa因子へと切断する。TFPIは、第VIIa因子および第Xa因子の両方に結合する。TFPI、第VIIa因子 (TFと結合している) と第Xa因子との間に形成された複合体は、維持された恒常性に必要な第Xa因子および第IXa因子の形成をさらに阻害する。Broze, Jr., Ann. Rev. Med., 46:103 (1995)。

20

【0010】

血流に直接導入された、エンドトキシンを含む細菌産物による凝固カスケードの活性化は、動脈表面への過度のフィブリン沈積、ならびに、フィブリノーゲン、プロトロンビン、第V因子および第VIII因子、ならびに血小板の枯渇を生じ得る。さらに、フィブリン溶解系が刺激され、フィブリン分解産物のさらなる形成が生じる。

【0011】

凝固活性化が、細菌産物 (例えば、エンドトキシン) によって明らかに開始されると同時に、反対の機構はまた、凝血、すなわち、フィブリン溶解系の活性化によって活性化されるようである。活性化された第XI因子は、プラスミノーゲンプロアクチベーターをプラスミノーゲンアクチベーターに転換し、これは次にプラスミノーゲンをプラスミンに転換して、それによって、凝血塊溶解を媒介する。それゆえに、血漿フィブリン溶解系の活性化はまた、出血傾向の一因となる。

30

【0012】

内毒血症は、組織プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI) の循環レベルの増加に関連する。このインヒビターは、組織プラスミノーゲンアクチベーター (TAP) を迅速に不活化し、それによって、プラスミノーゲンのプラスミンへの転換を介するフィブリン溶解を促進する能力を妨げる。フィブリン溶解を損なうことにより、血管中へのフィブリン沈積を引き起こし得、従って、敗血症ショックに関連するDICの一因となる。

40

【0013】

重症な肺炎および関連凝固障害の予防または処置のための満足のいく介入を同定するための努力が続いている。凝固経路を妨害する薬剤は、重症な肺炎の治療的処置または予防的処置としては、必ずしも効果的ではない。例えば、ヘパリンは、一般的に使用されている抗凝固剤である。しかし、ヘパリンの使用の管理は、困難である。なぜなら、ヘパリンは、過度の出血を誘発し得、そして、凝固異常を減衰させるが、生存利益は提供しないことが見出されているためである。例えば、Aokiら、「A Comparative Double-Blind randomized Trial of Activated Protein C and Unfractionated Heparin in

50

n the Treatment of Disseminated Intravascular Coagulation」、Int. J. Hematol. 75、540～47 (2002) を参照のこと。幾つかの臨床試験では、主に劇症DICが顕著な特徴である髄膜炎菌内毒血症において、ヘパリン処置による敗血症における死亡率の減少の実証は失敗に終わっている。例えば、Corriganら、「Heparin Thrapy in Septacemia with Disseminated Intravascular Coagulation. Effect on Mortality and on Correction of Hemostatic Defects」、N. Engl. J. Med. 283:778～782 (1970); Laschら、「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) を参照のこと。

10

【0014】

組換えヒトala-TFPI (TFPIアナログ) の投与は、敗血症の動物モデルにおいて生存率の改善を示してきた。例えば、米国特許第6,063,764号を参照のこと。内因性タンパク質として、TFPIは、十分に許容される。静脈内注入または皮下注射によるTFPI投与は、凝血能を低下させることが示されており、これは、増加したプロトロンビン時間 (PT) として表わされる。動物およびヒトの研究において、PTの延長は、血漿TFPIの増加に対して線形的に関連する。A. A. Creasey、Sepsis 3:173 (1999)。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

重症な肺炎の致死的作用を阻害し、そして同時に、潜在的に重症な副作用を最小限にする処置アプローチの必要性が、当該分野において存在したままである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

30

(発明の要旨)

本発明の1つの実施形態は、重症な肺炎に罹患するか、またはその発症の危険性にある患者にTFPIまたはTFPIアナログを投与する工程を包含する、重症な肺炎を予防または処置する方法である。幾つかの実施形態において、患者は、実証可能な感染を有する。

【0017】

本発明の別の実施形態は、重症な肺炎を処置するための方法であって、TFPIまたはTFPIアナログからなる群より選択される薬剤の持続的静脈内注入を、患者に投与する工程を包含する。幾つかの実施形態において、患者は、実証可能な感染を有する。

【0018】

他の実施形態は、上記の実施形態のいずれかを包含し、ここで、このTFPIまたはTFPIアナログは、約0.66mg/kg/時間より低い投薬率での参照ala-TFPIの投与と等価な投薬率で、持続的静脈内注入によって投与される。好ましい実施形態において、この投薬率は、約0.00025～約0.050mg/kg/時間の投薬率での参照ala-TFPIの投与に等価である。より好ましい実施形態において、この投薬率は、約0.010～約0.045mg/kg/時間の投薬率での参照ala-TFPIの投与に等価である。なおより好ましい実施形態において、このTFPIまたはTFPIアナログは、約0.025mg/kg/時間の投薬率での参照ala-TFPIの投与と等価な投薬率で投与される。別の好ましい実施形態において、この投薬率は、約0.024～約4.8mg/kgの合計投薬量での参照ala-TFPIの投与に等価な合計投薬量を提供するように投与される。別の好ましい実施形態において、この投薬率は、少なくとも

40

50

約 0.006 mg/kg および 約 1.2 mg/kg より低い毎日の投薬量での参照 a l a - T F P I の投与に等価な毎日の投薬量を提供するように投与される。

【0019】

他の実施形態は、上記の実施形態のいずれかを包含し、ここで、この T F P I または T F P I アナログは、少なくとも 72 時間で投与される。好ましい実施形態において、この T F P I または T F P I アナログは、少なくとも 96 時間で投与される。

【0020】

他の実施形態は、上記の任意の実施形態を包含し、ここで、この T F P I アナログは、非グリコシル化型 a l a - T F P I である。

【0021】

他の実施形態は、上記の実施形態のいずれかを包含し、ここで、この T F P I アナログは、配列番号 1 のアミノ酸 19 ~ 89 からなる第 1 の K u n i t z ドメインを含む。好ましい実施形態において、この T F P I アナログは、配列番号 1 のアミノ酸 90 ~ 160 からなる第 2 の K u n i t z ドメインをさらに含む。

【0022】

他の実施形態は、上記の実施形態のいずれかを包含し、ここで、この T F P I アナログは、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 160 を含むか、または、この T F P I アナログは、配列番号 1 のアミノ酸 90 ~ 160 からなる第 2 の K u n i t z ドメインを含む。

【0023】

他の実施形態は、上記の実施形態のいずれかを包含し、ここで、この T F P I または T F P I アナログは、T F P I または T F P I アナログを含む凍結乾燥組成物から調製される。

【0024】

他の実施形態は、上記の実施形態のいずれかを包含し、ここで、この T F P I または T F P I アナログは、アルギニンを含む処方物として投与される。

【0025】

他の実施形態は、前記 T F P I または T F P I アナログが、クエン酸を含む処方物として投与される、任意の上記実施形態を包含する。

【0026】

他の実施形態は、前記 T F P I または T F P I アナログが、約 300 mM 塩酸アルギニン および 約 20 mM クエン酸ナトリウムを含む約 5.5 の pH を有する処方物中において、約 0.15 mg/ml の濃度を有する、任意の上記実施形態を包含する。

【0027】

他の実施形態は、以下の工程をさらに包含する任意の上記実施形態を含む：前記 T F P I または T F P I アナログの投与と同時にまたはその 24 時間以内に、抗生物質、抗体、エンドトキシンアンタゴニスト、抗凝固薬活性を有する組織因子アナログ、免疫刺激薬、細胞接着ブロッカー、ヘパリン、B P I タンパク質、I L - 1 アンタゴニスト、p a f アーゼ (p a f a s e) (P A F 酵素インヒビター)、T N F インヒビター、I L - 6 インヒビター、および補体のインヒビターからなる群から選択されるさらなる薬剤を投与する工程。好ましい実施形態において、前記さらなる薬剤は、T N F、I L - 6、および M - C S F からなる群から選択される抗原に特異的に結合する抗体である。

【0028】

本発明のさらなる実施形態は、詳細な説明と共に以下に参照される図面を考慮して明らかである。

【0029】

(発明の詳細な説明)

T F P I または T F P I アナログの投与は、重症な肺炎の予防および処置において有効である。T F P I または T F P I アナログの連続的な低投薬量投与 (本明細書中以下、「低投薬量 T F P I 投与」) はまた、重症な肺炎の予防および処置において有効である。T F P I または T F P I アナログの投与 (特に、低投薬量投与) は、急性の炎症または慢性的

10

20

30

40

50

炎症（特に、重症な肺炎）を抑制するかまたは低減する。低投薬量 T F P I 投与が少なくとも 3 日間続く場合、重症な肺炎に由来する死の危険性が、低減する一方、有害な副作用（特に、出血障害）由来の合併症の割合は、最小化され得る。低投薬量 T F P I 投与のさらなる利点は、十分高い投薬量で、T F P I の血漿濃度を低下し得る、寛容効果を回避することである。寛容効果は、約 8 5 0 n g / m l の血漿 T F P I 濃度で最大の半分で刺激される一方、低投薬量 T F P I 投与を用いると、血漿レベルは、一般的に 5 0 0 n g / m l 未満にとどまる。低投薬量 T F P I 投与は、一般的に、T F P I または T F P I アナログの連続的な静脈内注入によって実施される。

【0030】

（T F P I および T F P I アナログ）

10

本明細書中で使用される場合、「T F P I」は、配列番号 1 に示される 2 7 6 アミノ酸残基配列を有し、約 3 8 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、成熟血清糖タンパク質をいう。この T F P I は、組織因子活性（従って、凝固活性化）の天然のインヒビターである。米国特許第 5 , 1 1 0 , 7 3 0 号は、組織因子（T F）を記載し、米国特許第 5 , 1 0 6 , 8 3 3 号は、T F P I を記載する。T F P I c D N A のクローニングは、W u n ら、米国特許第 4 , 9 6 6 , 8 5 2 号に記載される。T F P I は、プロテアーゼインヒビターであり、3 個の K u n i t z ドメインを有し、これらの 2 つは、それぞれ、第 V I I 因子および第 X a 因子と相互作用することが公知である。第 3 のドメインの機能は、未知のままである。T F P I は、不活性の、第 X a 因子：T F P I；第 V I I a 因子：組織因子四元複合体を形成することによって、凝固の開始をインビボで制限するように機能すると考えられる。R a p a p o r t , B l o o d 7 3 : 3 5 9 - 3 6 5 (1 9 8 9) および B r o z e ら、B i o c h e m i s t r y 2 9 : 7 5 3 9 - 7 5 4 6 (1 9 9 0) による総説を参照のこと。T F P I の多くの構造特徴は、他の良く研究されたプロテアーゼインヒビターとの相同性から推測され得る。T F P I は、酵素ではなく、おそらく、化学量論的様式で（すなわち、T F P I の K u n i t z ドメインの 1 つが 1 つのプロテアーゼ分子を阻害する）そのプロテアーゼ標的を阻害する。好ましくは、K u n i t z ドメイン 1 および / または 2 は、本発明の T F P I 分子中に存在する。K u n i t z ドメイン 3 の機能は、未知である。

20

【0031】

「T F P I アナログ」は、改変が T F P I 生物学的活性を破壊しない限り、1 つ以上のアミノ酸付加もしくは置換（一般的に、天然に保存される）、1 つ以上のアミノ酸欠失（例えば、T F P I フラグメント）、または 1 つ以上のアミノ酸に対する 1 つ以上の化学的部分の付加で、改変された T F P I 誘導体である。ポリペプチドアナログの作製方法は、当該分野で公知であり、以下にさらに記載される。好ましい T F P I アナログは、N - L - アラニル - T F P I (a l a - T F P I) であり、このアミノ酸配列は、配列番号 2 に示される。T F P I アナログは、下記されるような生物活性アッセイによって決定されるような、T F P I の活性のいくつかの測定法を保持する。T F P I およびアナログに対する好ましい生体活性アッセイは、プロトロンビン時間（P T）アッセイである（以下を参照のこと）。

30

【0032】

T F P I および T F P I アナログは、グリコシル化されているかグリコシル化されていないかのいずれかであり得る。T F P I のアナログは、米国特許第 5 , 1 0 6 , 8 3 3 号に記載される。A l a - T F P I は、国際薬物名「ティファコジン (t i f a c o g i n) 」でもまた公知である T F P I アナログである。a l a - T F P I は、成熟全長ヒト T F P I の全アミノ酸配列およびそのアミノ末端にさらなるアラニン残基を含む。a l a - T F P I のアミノ末端アラニン残基は、E . c o l i 発現を改善し、切断しなければアミノ末端メチオニン残基であるものの切断を実施するように、T F P I 配列に遺伝子操作される。米国特許第 5 , 2 1 2 , 0 9 1 号を参照のこと。

40

【0033】

特に好ましい T F P I アナログは、性質が保存される置換（すなわち、これらの側鎖に関

50

連するアミノ酸のファミリー内で生じる置換)を含む。具体的には、アミノ酸は、一般的に以下の4つのファミリーに分類される：(1)酸性 - - アスパラギン酸およびグルタミン酸；(2)塩基性 - - リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性 - - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；ならびに(4)非荷電性極性 - - グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、およびチロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時々、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンでの単独置換、アスパラギン酸のグルタミン酸での単独置換、トレオニンのセリンでの単独置換、または1つのアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸での同様に保存的な置換は、生物学的活性に対して大きな効果を有さないことが、適度に予測される。例えば、分子の所望の機能がインタクトのままである限り、目的のポリペプチドは、約1 ~ 70までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換(例えば、1、2、3、4、5、6 - 50、15 - 25、5 - 10、または1 ~ 70までの任意の整数)を含み得る。当業者は、本明細書中に記載されるような残存生物学的活性を適度に有する可能性のあるように改変され得る目的の分子の領域を容易に決定し得る。

10

【0034】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド部分の間のパーセント類似性をいう。2つのポリペプチド配列は、これらの配列が少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80% - 85%、好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95% - 98%の配列相同性、または特定の範囲の間での任意のパーセント相同性を、分子の規定された長さにならって示す場合、互いに「実質的に相同」である。本明細書中で使用される場合、「実質的に相同」はまた、特定のポリペプチド配列に対して完全な相同性を示す配列をいう。

20

【0035】

一般的に、「同一性」は、2つのポリペプチド配列のそれぞれ正確なアミノ酸 対 アミノ酸の一致をいう。パーセント同一性は、配列を整列し、2つの整列された配列の間の一致の正確な数を数え、より短い配列の長さによって除算し、そしてその結果に100を掛けることによる、2つの分子の間の配列情報の直接比較によって決定され得る。

【0036】

好ましくは、天然に存在するTFPIアナログまたは天然に存在しないTFPIアナログは、配列番号1に由来するTFPIに対して、少なくとも70%、80%、85%、90%または95%以上相同である、アミノ酸配列を有する。より好ましくは、これらの分子は、98%または99%相同である。パーセント相同性は、12のギャップ開放ペナルティーおよび2のギャップ伸長ペナルティー、ならびに62のBLOSUMマトリクスを用いたアフィンギャップ検索を使用する、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムを使用して決定される。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)に教示される。

30

【0037】

TFPIおよびTFPIアナログの生物学的活性は、プロトロンビンアッセイによって決定され得る。適切なプロトロンビンアッセイは、米国特許第5,888,968号およびWO96/40784に記載される。簡潔には、プロトロンビン時間は、凝固測定器(例えば、Organon Teknika製のCoag-A-Mate MTX II)を使用して決定され得る。適切なアッセイ緩衝液は、1mg/mlのウシ血清アルブミンを含み、pH7.5に調整された、100mM NaCl、50mM Trisである。必要なさらなる試薬は、正常ヒト血漿(例えば、Organon Teknika製の「Verify 1」)、トロンボプラスチン試薬(例えば、Organon Teknika製の「Simplastin Excel」)、およびTFPI標準試薬(例えば、アッセイ緩衝液1ml当たり、20μgの100%純粋ala-TFPI(またはその等価物))である。標準曲線は、一連のTFPI標準溶液の希釈(例えば、最終濃度は、1

40

50

～ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲にわたる) の凝固時間を分析することによって得られる。凝固時間の決定のために、サンプルまたは T F P I 標準が、まずアッセイ緩衝液中に希釈される。次いで、正常ヒト血漿が、添加される。凝固反応は、トロンボプラスチン試薬の添加によって開始される。次いで、装置は、凝固時間を記録する。線形 T F P I 標準曲線は、凝固時間の対数 対 T F P I 濃度の対数のプロットから得られる。標準曲線は、100% 純粋な標準の等価な T F P I 濃度に一致するように、T F P I 標準の純度に基づいて調整される。例えば、標準が、97% 生化学的に純粋である $\alpha 1\alpha$ - T F P I の調製物(すなわち、これは、T F P I の生物学的活性を有さない分子種を 3 重量% 含む)である場合、各標準の希釈物の濃度は、実際の T F P I の濃度を与えるように 0.97 を掛けられる。従って、97% 純粋である調製物 1 ml 当たりの実際の重量に基づいて 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である、T F P I 標準は、1.0 \times 0.97 の濃度(すなわち、0.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に等価であり、そのように処理される。

10

【0038】

(T F P I および T F P I アナログの入手)

本発明の方法において使用される T F P I および T F P I のアナログは、細胞または組織から単離および精製され得るか、化学的に合成され得るか、あるいは原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかにおいて組換え産生され得る。

【0039】

T F P I は、いくつかの方法によって単離され得る。例えば、T F P I を分泌する細胞としては、老化内皮細胞、約 3 ～ 4 日間 T N F で処理された若い内皮細胞、肝細胞、および肝癌細胞が挙げられる。T F P I は、従来の方法によって精製され得、この方法としては、P e d e r s e n ら、1990, J. B i o l . C h e m . 265, 16786 - 93, N o v o t n y ら、1989, J. B i o l . C h e m . 264, 18832 - 37, N o v o t n y ら、1991, B l o o d 78, 394 - 400, W u n ら、1990, J. B i o l . C h e m . 265, 16096 - 101, および B r o z e ら、1987, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 84, 1886 - 90 のクロマトグラフィー法が挙げられる。T F P I は、血流中に見られ、血液から精製され得る (P e d e r s e n ら、1990 を参照のこと)。

20

【0040】

T F P I または T F P I 変体は、アミノ酸配列を合成するための化学的方法を使用して (例えば、固相技術を使用した直接ペプチド合成によって) 産生され得る (M e r r i f i e l d, J. A m . C h e m . S o c . 85, 2149 - 2154, 1963; R o b e r g e ら、S c i e n c e 269, 202 - 204, 1995)。タンパク質合成は、手動技術を使用してかまたは自動制御によって実施され得る。自動合成は、例えば、A p p l i e d B i o s y s t e m s 431A P e p t i d e S y n t h e s i z e r (P e r k i n E l m e r) を使用して達成され得る。必要に応じて、T F P I または T F P I 変体のフラグメントは、別々に合成され得、化学的方法を使用して合わせられ、全長分子を生成し得る。

30

【0041】

T F P I および T F P I アナログは、米国特許第 4, 966, 852 号に示されるように組換え的に産生され得る。例えば、所望されるタンパク質に関する c D N A は、原核生物中または真核生物中における発現のためにプラスミドに組込まれ得る。米国特許第 4, 847, 201 号は、微生物の特定の D N A 配列での形質転換およびこれらの D N A 配列の発現について、詳細を提供する。微生物を使用したタンパク質の発現に関する詳細を提供する、当業者に公知の多くの他の参考文献が存在する。これらの多く (例えば、M a n i a t a s ら、1982, M o l e c u l a r C l o n i n g, C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s) が、米国特許第 4, 847, 201 号に引用される。

40

【0042】

微生物を形質転換し、そして、これらを使用して、T F P I および T F P I アナログを発現するための、種々の技術が公知である。以下は、可能なアプローチの単なる例である。

50

T F P I DNA配列は、単離され、そして適切な制御配列に連結されなければならない。T F P I DNA配列は、米国特許第4,966,852号に示され、Boehringer-Mannheimのような企業から市販されるプラスミド、(例えば、pUNC13またはpBR3822)に組込まれ得る。一旦、T F P I DNAが、ベクター中に挿入されると、このDNAは、適切な宿主にクローン化され得る。DNAは、Mullisに対する米国特許第4,683,202号およびMullisらに対する米国特許第4,683,195号に示されるような技術によって増幅され得る。T F P I cDNAは、細胞(例えば、肝癌細胞(例えば、HepG2およびSKHep))を誘導し、T F P I mRNAを作製し、次いでmRNAを同定および単離し、T F P Iに対するcDNAを得るためにこれを逆転写することによって得られ得る。発現ベクターがE. coliのような宿主に形質転換された後、この細菌は、発酵され得、タンパク質が発現され得る。好ましい原核微生物は、細菌であり、E. coliは、特に好ましい。本発明で有用な好ましい微生物は、E. coli K-12(Budapest条約の条項の下で、1984年2月14日にATCCに寄託されたMM294株(受託番号39607))である。

10

【0043】

もちろん、多細胞生物由来の真核生物宿主細胞培養物において、遺伝子コードポリペプチドを発現することもまた可能である。例えば、Tissue Culture, 1973, CruzおよびPatterson編、Academic Pressを参照のこと。有用な哺乳動物細胞株としては、マウス骨髄腫N51、VERO、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、COS, C127、HepG2、およびSKHepが挙げられる。T F P IおよびT F P Iアナログはまた、バキュロウイルス感染昆虫細胞において発現され得る(上記に参照される、米国特許第4,847,201号もまた参照のこと)。Pedersenら、1990, J. of Biological Chemistry, 265:16786-16793もまた参照のこと。真核生物細胞用の発現ベクターは、通常、哺乳動物細胞と適合性のプロモーターおよび制御配列(例えば、Simian Virus 40(SV40)由来の通常使用される初期プロモーターおよび後期プロモーター(Fiersら、1978, Nature, 273:113)、または他のウイルスプロモーター(例えば、ポリオーマ、Adenovirus 2、ウシパピローマウイルス、またはトリ肉腫ウイルス由来のようなウイルスプロモーター)、または免疫グロブリンプロモーターおよび熱ショックプロモーター)を含む。哺乳動物宿主系形質転換の一般的な局面は、Axelによって米国特許第4,399,216号に記載された。「エンハンサー」領域は、発現を最適化することにおいて重要であり、これらは、一般的に、プロモーター領域の上流に見出される配列であることが、ここでも明らかになる。複製起点は、必要な場合、ウイルス供給源から得られ得る。しかし、染色体への組み込みは、真核生物におけるDNA複製のための共通の機構である。ここで、植物細胞もまた、宿主として利用可能であり、植物細胞と適合性の制御配列(ノパリンシンターゼプロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列など(Depicker, Aら、1982, J. Mol. Appl. Gen., 1:561))は、入手可能である。植物細胞の形質転換のための方法およびベクターは、WO85/04899に開示される。

20

30

【0044】

哺乳動物細胞において発現されるT F P IおよびT F P Iアナログの精製のために使用され得る方法は、heparin-Sepharose、MonoQ、MonoS、および逆相HPLCクロマトグラフィーの連続的適用を含む。Pedersenら(上述); Novotnyら、1989, J. Biol. Chem. 264:18832-18837; Novotnyら、1991, Blood, 78:394-400; Wunら、1990, J. Biol. Chem. 265:16096-16101; Brozeら、1987, PNAS(USA), 84:1886-1890; 米国特許第5,106,833号; および米国特許第5,466,783号を参照のこと。これらの参考文献は、哺乳動物産生T F P Iを精製するための種々の方法を記載する。

40

【0045】

50

T F P I はまた、哺乳動物細胞宿主（マウス C 1 2 7 細胞（D a y ら、B l o o d 7 6 , 1 5 3 8 - 4 5 , 1 9 9 0 ）、胎仔ハムスター腎臓細胞（P e d e r s e n ら、1 9 9 0 ）、チャイニーズハムスター卵巣細胞、およびヒト S K 肝癌細胞など）を使用して組換えグリコシル化型タンパク質として発現され得る。C 1 2 7 T F P I は、動物の研究において使用され、ウサギにおける組織因子誘導性脈管内凝固の阻害（D a y ら（上述））、イヌにおける血栓崩壊後の動脈再閉塞の予防（H a s k e l ら、C i r c u l a t i o n 8 4 : 8 2 1 - 8 2 7 (1 9 9 1) ）、およびヒビにおける E . c o l i 肺血症モデルにおける死亡率の減少（C r e a s e y ら、J . C l i n . I n v e s t . 9 1 : 2 8 5 0 (1 9 9 3) ）において効果的であることが示された。a l a - T F P I は、E . c o l i 宿主細胞を使用して組換え非グリコシル化型タンパク質として発現され得る。E . c o l i において産生される組換えタンパク質のインピトロ再折りたたみによって高度に活性な a l a - T F P I を産生する方法が、記載される。例えば、W O 9 6 / 4 0 7 8 4 を参照のこと。

10

【0046】

T F P I および T F P I アナログはまた、細菌または酵母において産生され、続いて精製され得る。一般的に米国特許第 5 , 2 1 2 , 0 9 1 号；同第 6 , 0 6 3 , 7 6 4 号；および同第 6 , 1 0 3 , 5 0 0 号または W O 9 6 / 4 0 7 8 4 に示される手順が使用され得る。a l a - T F P I および他の T F P I アナログは、W O 9 6 / 4 0 7 8 4 および G u s t a f s o n ら、P r o t . E x p r e s s . P u r . 5 : 2 3 3 (1 9 9 4) （これらは、本明細書中に参考として援用される）に従って、精製され、可溶化され、そして再折りたたみされ得る。例えば、W O 9 6 / 4 0 7 8 4 の実施例 9 に従って調製される場合、成熟しており、適切に折りたたまれ、生物学的に活性である a l a - T F P として、総タンパク質の約 8 5 重量% ~ 9 0 重量% の a l a - T F P I および 1 つ以上の酸化メチオニン残基を有する約 1 0 重量% ~ 1 5 重量% の a l a - T F P I を含む、a l a - T F P I の調製物が得られ得る。これらの酸化形態は、プロトンビンアッセイによって決定される場合、非誘導化 a l a - T F P I の生物学的活性に等価である生物学的活性を有し、本明細書中において記載される本発明において活性であることが予想される。残存物質は、a l a - T F P I の種々の改変形態を含み、この形態としては、二量体化形態、凝集化形態、およびアセチル化形態が挙げられる。

20

【0047】

T F P I および T F P I アナログは、有意な数のシステイン残基を有し、そして米国特許第 4 , 9 2 9 , 7 0 0 号に示される手順は、T F P I 再折りたたみに関連する。T F P I およびアナログは、種々のクロマトグラフィー法（例えば、上記されるクロマトグラフィー法）によって緩衝溶液から精製され得る。所望の場合、米国特許第 4 , 9 2 9 , 7 0 0 号に示される方法が、使用され得る。任意の方法は、T F P I および T F P I アナログを精製するために使用され得、ヒトへの投与に適切な精製度および活性のレベルを得る。

30

【0048】

（治療法および組成物）

一般的に、T F P I および T F P I アナログは、組織因子発現のアップレギュレーションに起因して生じるような疾患を処置または予防するために有用であり、従って、T F 活性は、T N F、I L - 1 または他のサイトカインによって生じる。T F P I 投与（および特に、低投薬量 T F P I 投与）は、患者において、サイトカイン（例えば、I L - 6）の濃度を低下させ得る。低投薬量 T F P I 投与は、一般に、炎症異常および凝固異常（急性炎症状態および慢性炎症状態（例えば、重症な肺炎）が挙げられる）を処置するために有用である。

40

【0049】

「重症な肺炎」は、A m e r i c a l T h o r a c i c S o c i e t y によって示される指針に従って規定される。具体的には、重症な肺炎は、肺炎の診断および a) 2 つの主要な基準の 1 つ、b) 3 つの主要でない基準のうちの 2 つ、または c) B r i t i s h T h o r a c i c S o c i e t y (T h o r a x 2 0 0 1 ; 5 6 [補遺 I V] : 1

50

- 64) からの、4つの基準からの2つの存在を必要とする。主要な基準は、1) 機械的な通気の必要性および2) 敗血症性ショックまたは4時間を超える間の昇圧の必要性である。主要でない基準は、1) 90 mmHg以下の収縮期血圧、2) 複数大葉性肺炎、および3) 250未満の低酸素基準 (PaO_2 / FiO_2) である。British Thoracic Societyからの基準は、1) 30呼吸/分以下の呼吸速度、2) 60 mmHg以下の弛緩期血圧、3) 7.0 mMを超える (19.6 mg/dL を超える) 血液尿素窒素 (BUN) および4) 錯乱である。当該分野において理解されるように、低酸素基準 (PaO_2 / FiO_2) は、吸気酸素フラクションに対する動脈酸素の分圧をいい、ガス交換の障害のレベルを示す。

【0050】

好ましくは、重症な肺炎を有する患者は、当該分野で公知の任意の手段によって明白な感染を有する。これらの方法としては、例えば、GRAM染色、培養物、組織化学染色、免疫化学アッセイ、または核酸アッセイによって、血液または他の通常滅菌される体液あるいは組織の培養物中の病原生物の検出が挙げられるがこれらに限定されない。明白な感染はまた、全身性抗感染療法および任意の感染の臨床症状 (30/分以上の呼吸速度または250未満の PaO_2 / FiO_2 、血圧の低下、および体温の上昇が挙げられるがこれらに限定されない) に対する原因を構築する肺炎の診断と一致する胸部X線写真によって示される。

【0051】

(TFPIの処方物およびTFPIアナログの処方物)

TFPIの処方物およびTFPIアナログの処方物は、好ましくは、静脈内注入によって投与される。本質的に連続的な静脈注入が、好ましい。この投与を達成するための方法は、当業者に公知である。注入は、中心系または末梢系によって実施され得る。投薬速度の大きな変動が避けられるべきであるのに対して、本発明の投薬率からの短期間の偏差は、許容される。但し、投与されたTFPIの得られる血漿レベルは、本発明の好ましい実施形態に従う一定の投薬率での連続注入から予想されるレベルの20%以内である。

【0052】

患者への投与の前に、処方物は、TFPIおよびTFPIアナログに添加され得る。液体処方物が好ましい。TFPIおよびTFPIアナログは、種々の濃度で、種々の製剤化剤を使用し、そしてTFPIタンパク質の投与経路、TFPIタンパク質の溶解度、そしてTFPIタンパク質の安定性に適合性の生理学的に適切なpHで処方され得る。静脈内注入のための好ましい処方物は、約0.6 mg/mlまでのala-TFPI、300 mMまでの塩酸アルギニン、およびpH 5.0 ~ 6.0のクエン酸ナトリウム緩衝液を含有する。アルギニン、NaCl、スクロース、およびマンニトールのような特定の溶質は、ala-TFPIを可溶化し、そして/または安定化するために提供される。WO 96/40784を参照のこと。静脈内注入のために特に好ましい処方物は、約0.15 mg/mlのala-TFPI、300 mMの塩酸アルギニン、および20 mM クエン酸ナトリウム (pH 5.5) を含有する。TFPIおよびTFPIアナログはまた、150 mM NaClおよび20 mM リン酸ナトリウムまたは別の緩衝液 (pH 5.5 ~ 7.2) 中に (必要に応じて0.005%または0.01% (w/v) のポリソルベート80 (Tween 80) を補充して)、約0.15 mg/mlまでの濃度で処方され得る。他の処方物は、150 mM NaCl、8% (w/v) スクロース、または4.5% (w/v) マンニトールを含む、10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.5) 中に、約0.5 mg/mlまでのTFPIまたはTFPIアナログを含有する。TFPIおよびTFPIアナログはまた、高塩を使用して、数mg/mlまでのより高い濃度で処方され得る。例えば、1つの処方物は、500 mM NaClおよび20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) 中に、約6.7 mg/mlまでのala-TFPIを含有する。

【0053】

TFPIおよびTFPIアナログに関する処方物のさらなる例としては、油、ポリマー、ビタミン、炭化水素、アミノ酸、塩類、緩衝剤、アルブミン、界面活性剤、または充填剤

10

20

30

40

50

が挙げられる。好ましい炭化水素としては、単糖類、二糖類、もしくは多糖類、または水溶性グルカンのような糖類または糖アルコールが挙げられる。糖類またはグルカンは、フルクトース、デキストロース、ラクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、スクロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、およびシクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、およびカルボキシメチルセルロース、またはそれらの混合物を含み得る。スクロースが最も好ましい。糖アルコールは -OH 基を有する $C_4 \sim C_8$ の炭化水素と定義され、そしてガラクトール (galactitol)、イノシトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、グリセロール、およびアラビトールを含む。マンニトールが最も好ましい。上述のこれらの糖または糖アルコールは、単独でまたは組み合わせて用いられ得る。糖類または糖アルコールが水性調製物中で可溶である限りは、用いられる量に確固たる制限はない。好ましくは、糖類または糖アルコール濃度は 1.0 w/v % と 7.0 w/v % との間であり、より好ましくは 2.0 と 6.0 w/v % との間である。

10

【0054】

好ましくは、アミノ酸は左旋性 (L) 体のカルニチン、アルギニン、およびベタインを含む；しかし、他のアミノ酸も加えられ得る。好適なポリマーとしては、平均分子量 2,000 と 3,000 との間のポリビニルピロリドン (PVP)、または平均分子量 3,000 と 5,000 との間のポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。凍結乾燥前または再構成後の溶液の pH 変化を最小にする組成の緩衝液を用いることもまた好ましい。ほとんどの任意の生理緩衝液が用いられ得るが、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、およびグルタミン酸緩衝液またはそれらの混合物が好ましい。好ましくは、緩衝液の濃度は 0.01 ~ 0.3 M である。調剤に添加され得る界面活性剤は、欧州特許第 270,799 号および同第 268,110 号に示される。

20

【0055】

さらに、TFPI および TFPI アナログは、例えば、循環半減期を延長させるために、ポリマーを共有結合することで化学修飾され得る。好適なポリマー、およびペプチドにポリマーを結合させる方法は米国特許第 4,766,106 号、同第 4,179,337 号、同第 4,495,285 号、および同第 4,609,546 号に教示される。好適なポリマーはポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール (PEG) である。PEG は室温で水に可溶であり、そして一般式： $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ (ここで R は水素、またはアルキル基もしくはアルカノール基のような保護基であり得る) を有する。好ましくは、保護基は 1 個と 8 個との間の炭素を有し、より好ましくは保護基はメチル基である。記号 n は正の整数であり、好ましくは 1 と 1,000 との間、より好ましくは 2 と 500 との間である。好ましくは、PEG は 1000 と 40,000 との間の平均分子量を有し、より好ましくは 2000 と 20,000 との間であり、最も好ましくは 3,000 と 12,000 との間である。好ましくは、PEG は少なくとも 1 個のヒドロキシ基を有し、より好ましくはそれは 1 個の末端ヒドロキシ基である。このヒドロキシ基は好ましくは活性化されて、インヒビター上の遊離アミノ基と反応する。しかし、反応基のタイプおよび量は本発明の共有結合 PEG/TFPI を完成させるために変えられ得ることが理解される。

30

40

【0056】

水溶性ポリオキシエチル化ポリオールもまた本発明において有用である。これらポリオキシエチル化ポリオールとしては、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール (POG) などが挙げられる。POG が好ましい。1つの理由は、ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロール骨格が、モノ、ジ、トリグリセリドにおいて、例えば、動物およびヒトにおいて天然に存在する同様の骨格だからである。それゆえ、この分枝鎖は必ずしも体内で外来因子としてみなされない。POG は PEG と同様の範囲の好適な分子量を有する。POG の構造は Knauf ら、1988, J. Bio. Chem. 263: 15064-15070 に示され、そして POG/タンパク質結合体の説明が米国特許第 4,766,106 号に見出される。

50

【 0 0 5 7 】

T F P I または T F P I アナログの液体薬学的組成物の調製後、それは分解の防止および無菌保存のために、凍結乾燥され得る。液体組成物の凍結乾燥法は当業者に公知である。使用直前に、組成物は添加成分を含み得る滅菌希釈剤（例えば、リンゲル溶液、蒸留水、または滅菌生理食塩水）で再構成され得る。再構成によって、好ましくは、組成物は、連続注射によって被験体に投与される。

【 0 0 5 8 】

（ T F P I および T F P I アナログの投薬量 ）

T F P I および T F P I アナログは、重症な肺炎を処置および予防するための治療的有效な濃度で投与される。このような投薬量はまた、他の急性炎症または慢性炎症、およびサイトカインが組織因子の発現をアップレギュレートする一般的な疾患にとっても有用である。この目的を達成するために、T F P I または T F P I アナログは、好ましくは、静脈内に投与される。この投与を達成するための方法は、当業者に公知である。一般的に、T F P I または T F P I アナログは、 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ と $20 \text{mg} / \text{kg}$ との間、より好ましくは、 $20 \mu\text{g} / \text{kg}$ と $15 \text{mg} / \text{kg}$ との間、最も好ましくは、 1 と $10 \text{mg} / \text{kg}$ との間の投薬量で与えられる。

10

【 0 0 5 9 】

上記の投薬量は、一般的に、単回投与または分割投与において宿主に投与される 1 日の合計投薬量が、例えば、1 日あたり約 $2 \sim 15 \text{mg} / \text{体重 kg}$ 、好ましくは約 $4 \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ の量であり得るように、少なくとも約 1 日、通常数日の期間にわたって投与される。投薬単位組成物は、1 日投薬量で作られるような量またはその約数を含み得る。より低い 1 日投薬量（例えば、 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 2 \text{mg} / \text{kg}$ ）は、予防または他の目的のために有用であり得る。単回投薬形態を生成するためのキャリア物質と組み合わせられ得る活性成分の量は、処置される患者および投与の特定様式に依存して変動する。

20

【 0 0 6 0 】

投薬レジメンは、以下に挙げられる種々の要因に従って選択される：型、年齢、体重、性別、食事および患者の病態（*medical condition*）、状態の重篤度、投与経路、薬理学的配慮（例えば、活性、有効性、薬物動態学的特性および毒性）、薬物送達系が利用されるか否か、そして化合物が複合薬の一部として投与されるか否か。従って、実際に使用される投薬レジメンは広範に変化し得、従って上記の好ましい投薬レジメンから逸脱し得る。好ましくは、T F P I または T F P I アナログの投薬量は、約 $0.66 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間}$ の *ala* - T F P I の投与率に等しい投与率を超えるべきではない。

30

【 0 0 6 1 】

（ 低投薬量投与 ）

T F P I または T F P I アナログが、*ala* - T F P I の投与（少なくとも約 $0.00025 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間}$ （ $0.00417 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ ）および約 $0.050 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間未満}$ （ $0.833 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ ）の投与率）に等しい投与率で与えられる場合、重症な肺炎を処置する有効性は保持され、そして有害な副作用（例えば、出血）は最小化される。組み合わせの有効性および安全性を改善するために、投与率は、好ましくは少なくとも約 $0.010 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間}$ （ $0.167 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ ）および約 $0.045 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間}$ （ $0.833 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ ）未満の *ala* - T F P I の投与率に等しいか、または少なくとも約 $0.020 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間}$ および約 $0.040 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間未満}$ の *ala* - T F P I の投与率に等しく、そして最も好ましくは、約 $0.025 \text{mg} / \text{kg} / \text{時間}$ （ $0.417 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ ）の *ala* - T F P I の投与率に等しい。投与経路は、一般的に、静脈内投与（連続静脈内注入が好ましい）による。注入は、少なくとも約 72 時間、96 時間、120 時間、または 240 時間で投与され得る。好ましくは、連続注入は、3 ~ 8 日間、より好ましくは 3 ~ 6 日間、そして最も好ましくは約 4 日間投与される。

40

【 0 0 6 2 】

「連続注入（*infusion*）によって」投与することは、この注入が、処方されたほ

50

とんどの持続時間にわたって実質的に中断されずに、ほぼ処方された速度で維持されることを意味する。あるいは、断続的な静脈内注入が使用され得る。断続的な注入が使用される場合、連続注入についての上記の投与率に等しい時間平均投与率が使用されるべきである。さらに、断続注入のプログラムは、連続注入を用いて得られる最大濃度の約20%以下の最大血清中濃度を得なければならない。患者における有害な反応（特に、出血を含む副作用）を回避するために、投薬率は、 ala-TFPI （約 0.050 mg/kg/時間 ）の連続静脈内注入に等しい投与率未満であるべきである。

【0063】

本明細書中に記載される全ての投薬量（投与率および全投薬量を含む）は、実際には、プロトロンビンアッセイでのタンパク質濃度および生物学的活性の決定の誤差に起因して、10%までの変動を生じる。従って、本明細書中に記述される投薬量より10%まで高いかまたは10%まで低い、任意の実際に投与される投薬量は、記述された投薬量と等しいとみなされる。この理由のために、全ての投薬量は、「およそ（約）」特定投薬量として記述されている。例えば、「約 0.025 mg/kg/時間 」と記述される投薬量は、 $0.0225 \sim 0.0275 \text{ mg/kg/時間}$ の範囲にわたる任意の実際の投薬量に等しいとみなされる。

10

【0064】

TFPI または TFPI アナログのボーラス注射または短時間のより高い注入速度はまた、後に低投薬量の TFPI 投与が続く場合に、本発明の実施において使用され得る。例えば、ボーラス注射またはより高い注入速度は、患者の循環における投与された TFPI または TFPI アナログの平衡時間を減少させるために使用され得る。その際に、 TFPI の最終定常状態の血漿中レベルは、より迅速に達成され得、そして TFPI に対するレセプターはより速く飽和され得る。 ala-TFPI の約 0.025 mg/kg/時間 で2時間にわたるヒトへの投与は、 TFPI （および ala-TFPI ）の血漿中レベルを約 $80 \text{ ng/ml} \sim 125 \text{ ng/ml}$ に増加させるか、または約50%増加させる。注入速度が高められるかまたはボーラス注射が使用される場合、同じレベルはより速く達成される。注入が定常状態を得られるまで続けられる場合、より速い注入速度は、より高いレベルを生じる。敗血症に罹患した患者において、約 0.050 mg/kg/時間 での ala-TFPI 投与に対する定常状態レベルは、約 300 ng/ml であることが分かっており、そして約 0.33 mg/kg/ml または 0.66 mg/kg/時間 での ala-TFPI 投与に対しては、少なくとも約 $2 \mu\text{g/ml}$ であることが見出された。

20

30

【0065】

単回連続注入投与または分割注入投与で宿主に投与される1日の合計投薬量は、例えば、少なくとも約 $0.006 \text{ mg/kg/1日} \sim 1.2 \text{ mg/kg/1日}$ の ala-TFPI の投与に等しく、より一般的には、約 $0.24 \text{ mg/kg/1日} \sim 1.2 \text{ mg/kg/1日}$ 投薬量の ala-TFPI の投与に等しく、そして好ましくは約 0.6 mg/kg/1日 の ala-TFPI に等しい量であり得る。この範囲内でのより低い量は、予防または他の目的のために使用され得る。本発明の投与プロトコルはまた、患者に投与される合計投薬量としても表され得る。合計投薬量は、注入速度 \times 総注入時間である。例えば、 ala-TFPI についての好ましい投与率（約 0.025 mg/kg/時間 ）かつ好ましい注入時間（96時間）において、合計投薬量は、体重 1 kg あたり約 2.4 mg ala-TFPI である。本発明に従って投与される TFPI の合計投薬量は、少なくとも約 $0.75 \mu\text{g/kg}$ かつ約 4.8 mg/kg 未満の ala-TFPI に等しい。好ましくは、合計投薬量は、少なくとも約 1 mg/kg かつ約 4.8 mg/kg 未満の ala-TFPI に等しい。より好ましくは、合計投薬量は、約 2.4 mg/kg の ala-TFPI に等しい。

40

【0066】

投薬レジメンを調整するために使用され得る1つの因子は、個々の患者の凝固機能であり、これは、代表的にはプロトロンビン（PT）時間アッセイ、すなわち国際標準比（INR）を用いて測定される。INRは、PTアッセイの標準化であり、このアッセイは国際

50

参照トロンビン試薬に対して較正される。例えば、R. S. Rileyら、J. Clin. Lab. Anal. 14: 101-114 (2000)を参照のこと。健康なヒトボランティアにおけるa1a-TFPIに対するINR応答は、認められる血漿中濃度の範囲にわたってほぼ直線である(図3)。INRにおける全体に変化は、血漿a1a-TFPI濃度の $1\mu\text{g/ml}$ の増加あたり1.2単位である。

【0067】

薬力学的モデルにおいて、a1a-TFPIに対するINR反応は、対数INRがa1a-TFPIの血漿中濃度に比例した、対数線形モデルによって最も説明される。この対応の対数線形特性は、INRの高いベースラインを有する被験体が、おそらく、低ベースライン値を有する被験体(同レベルの循環a1a-TFPIを有する)よりもより高い抗凝固反応に直面することを意味する。 10

【0068】

上記の投与レジメン(mg/kg/時間 基準に対する投与率および1日の合計投薬量を含む)は、「参照a1a-TFPIの投与に等しい」投薬量として表される。このことは、「参照a1a-TFPI」の投薬量に対して正規化することによって定量的に決定されることを意味する。参照a1a-TFPIは、成熟した、100%純粋な(タンパク質を基準)、適切に折り畳まれ、生物学的に活性な、非グリコシル化型a1a-TNPIとして規定される。a1a-TFPIは、配列番号2に示されるアミノ酸配列のTFPIのアナログである。TFPIの他の形態もまた、本発明において使用され得、これらとしては、成熟した、完全長のTFPIおよびそのアナログが挙げられる。a1a-TFPI以外のTFPIの形態および100%未満純粋なa1a-TFPIもしくは別のTFPIアナログの調製物を用いて本発明を実施するために適切な投薬量範囲を決定するために、参照a1a-TFPIについて本明細書中に記載される投薬量範囲は、TFPIの特定形態の内因的な生物学的活性に基づいて調整され得、そしてさらに調製物の生物学的純度に基づいて調整され得る。 20

TFPIまたはTFPIアナログの内因的な生物学的活性は、成熟、100%の純度、適切に折り畳まれたTFPIまたはTFPIアナログのプロトロンビンアッセイによって規定されるような特定の活性をいう。従って、等しい投薬量は、

(参照a1a-TFPI投薬量) / ((相対的な内因性活性) × (生化学的純度))

として算出され、ここで、相対的な内因性活性とは、 30

(アナログの内因性活性) / (参照a1a-TFPIの内因性活性)

をいう。例えば、特定のTFPIアナログが参照a1a-TFPIの80%の内因性生物学的活性を有する場合、特定のTFPIアナログについて等しい投薬量は、参照a1a-TFPIの投薬量値を0.8で除算することによって得られる。さらに、患者に投与される処方物が、例えば、90%だけ生物学的に純粋である(すなわち、10%の、TFPIの生物学的活性を欠く分子種を含む)場合、a1a-TFPIについての参照投薬量値のさらなる補正は、この投薬量値を0.9で除算することによって実施される。従って、80%のa1a-TFPIの内因性活性を有しかつ90%の生物学的純度を有する仮想上のTFPIアナログが投与された場合、参照a1a-TFPIの投与(0.025mg/kg/時間)に等しい投与率は、 0.0347mg/kg/時間 (すなわち、 $0.025 / (0.8 \times 0.9)$)である。 40

【0069】

等しい投薬量はまた、相対的な生物学的活性を決定することによって、内因性活性もしくは生物学的純度のいずれも知ることなしに決定され得る。相対的生物学的活性は、プロトロンビン時間アッセイを用いて、TFPI生物学的活性標準と特定のTFPIアナログとを比較することによって決定され得る。例えば、WO 96/40784の実施例9の方法に従って生成されたa1a-TFPIは(これは、約85%生物学的に活性なTFPI分子種を含む)は、TFPI生物学的活性標準として使用され得る。WO 96/40784の実施例9の方法に従って生成されたa1a-TFPIは、プロトロンビンアッセイにおいて、参照a1a-TFPIの約85%の活性を有する。プロトロンビン時間標準曲 50

線をプロットする際、凝固時間の対数はTFPI濃度の対数に対してプロットされる。TFPI生物学的活性標準が参照a1a-TFPIの活性の85%を有する場合、標準曲線は、TFPI生物学的活性の標準の濃度はプロットする前に0.85を乗じ場合の参照a1a-TFPIに等しくなるように調製され得、その結果、活性プロットは100%純粋な参照a1a-TFPIの活性に等しくなる。特定のTFPIアナログについての凝固時間が標準曲線と比較される場合、参照a1a-TFPIの等濃度は、この曲線から読み取られ得る。あるいは、標準曲線の直線部分のスロープが直線回帰分析によって得られる場合、このスロープは参照a1a-TFPIに比例するTFPI生物学的活性標準の活性に基づいて補正され得る。従って、特定のTFPIアナログの相対的生物学的活性は、アナログの活性に対する参照a1a-TFPI活性の割合に等しい。例えば、特定のアナログが、1 μ gの参照a1a-TFPIと同じプロトロンビン活性を生じるために1.43 μ gを必要とする場合、このアナログの相対的な生物学的活性は、1.00/1.43、または0.7である。このアナログについて、参照a1a-TFPI投薬量に等しい投薬量は、参照a1a-TFPI投薬量をアナログの相対的な生物学的活性で除することによって得られる。例えば、参照a1a-TFPIについての0.025mg/kg/時間投薬量は、アナログの0.0357mg/kg/時間(すなわち、0.025/0.7)に等しい。

10

【0070】

TFPIまたはTFPIアナログは、単独の活性抗凝固薬剤として投与され得るが、これらの分子はまた、重症な(sever)肺炎の処置のための組み合わせ療法を提供するために、1つ以上のさらなる治療剤と組み合わせて使用され得る。このようなさらなる治療剤としては、例えば、抗エンドトキシンモノクローナル抗体(例えば、エンドトキシン結合Mab)および抗TNFマウスMabのような抗TNF生成物のような抗体が挙げられる。TFPIおよびTFPIアナログはまた、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、殺菌/浸透増進(BPI)タンパク質、免疫賦活剤、抗炎症活性を有する化合物(例えば、PAFアンタゴニスト)、および細胞接着ブロッカー(例えば、GPIIb/IIIaインヒビターのような抗血小板因子)と組み合わせ得る。組み合わせとして投与される場合、治療剤は、同時または別の時点で与えられる別個の組成物として処方され得る。好ましくは、さらなる治療剤は、同時(すなわち、TFPIもしくはTFPIアナログの投与の間)またはTFPIもしくはTFPIアナログの投与期間の24時間以内(すなわち、TFPIもしくはTFPIアナログの投与期間の開始前24時間以内、またはTFPIもしくはTFPIアナログの投与期間後24時間以内)のいずれかで与えられる。さらなる治療剤はまた、TFPIもしくはTFPIアナログと一緒に単一組成物としても与えられ得る。

20

30

【0071】

TFPIまたはTFPIアナログはまた、重症な(sever)肺炎の処置に有効である他の薬剤と組み合わせて与えられ得る。例えば、以下のものがTFPIまたはTFPIアナログと組み合わせて投与され得る：根元的な細菌感染を治療し得る抗生物質；細菌細胞壁成分に対するモノクローナル抗体；重症な肺炎経路に関与するサイトカインと複合体を形成し得るレセプター；および一般に、サイトカインまたは他の活性化もしくは増大された生理学的経路(補体タンパク質を含む)と相互作用し得、重症な肺炎および/もしくはその症状を改善させる任意の因子またはタンパク質。

40

【0072】

有用な抗生物質は一般的な部類の内の以下を含む：ラクタム環(ペニシリン)、グリコシド結合におけるアミノ糖類(アミノグリコシド)、大環状ラクトン環(マクロライド)、ナフタセンカルボキサミド(naphthacene carboxamide)の多環式誘導体(テトラサイクリン)、ジクロロ酢酸のニトロベンゼン誘導体、ペプチド(バシトラシン、グラミシジン、およびポリミキシン)、共役二重結合系大環状物(ポリエン)、スルファニルアミド(sulfanilamide)由来のサルファ剤(スルホンアミド)、5-ニトロ-2-フラニル基(ニトロフラン)、キノロンカルボン酸(ナリジクス酸

50

)、および他多数。他の抗生物質および上記の特定の抗生物質のさらなる改良体は、Encyclopedia of Chemical Technology、第3版、Kirk-Othmer (編)、第2巻、782~1036頁(1978)および第3巻、1~78頁、Zinsser、Microbiology、第17版、W. Joldikら(編)235~277頁(1980)、またはDorland's Illustrated Medical Dictionary、第27版、W. B. Saunders Company (1988)中に見出され得る。

【0073】

TFPIまたはTFPIアナログと組み合わせられ得る他の薬剤としては、エンドトキシンアンタゴニスト(例えば、E5531(a Lipid A analog、Asaiら、Biol. Pharm. Bull. 22:432(1999)を参照のこと)、抗凝固活性を有するTFアナログ(例えば、Kelleyら、Blood 89:3219(1997)およびLee & Kelley, J. Biol. Chem. 273:4149(1998)を参照のこと)、サイトカインに特異的なモノクローナル抗体(例えば、IL-6もしくはM-CSFに対して特異的なモノクローナル抗体(1989年12月15日に出願された米国特許出願番号07/451,218を参照のこと)およびTNFに対して特異的なモノクローナル抗体(Ceramiら、米国特許第4,603,106号を参照のこと)、TNFプロホルモン産生細胞からの成熟TNFプロホルモンを切断するタンパク質のインヒビター(1989年8月16日に出願された米国特許出願番号07/395,253を参照のこと)、IL-1のアンタゴニスト(1990年5月1日に出願された米国特許出願番号07/517,276を参照のこと)、インヒビン(inhibin)のようなIL-6サイトカイン発現のインヒビター(米国特許第5,942,220号を参照のこと)、ならびにIL-1のような種々のサイトカインのレセプターに基づくインヒビターが挙げられる。補体に対する抗体または補体のタンパク質インヒビター(例えば、CR₁、DAF、およびMCP)もまた用いられ得る。

【0074】

本開示において引用される全ての特許、特許出願および参考文献は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0075】

本発明は、ここで以下の実施例に言及することにより例証される。この実施例は特に有益な実施態様を記載する。しかし、これら実施態様は例示であって、いかなるようにも本発明を制限するものとして解釈されるものではないことは留意されるべきである。

【実施例】

【0076】

(実施例1:重症な肺炎患者のala-TFPI処置)

重症な肺炎を有する患者を、相対的に同種のグループ内でala-TFPIでの処置の潜在的な効果を探索するために評価した。肺炎患者を、研究者によって考証された敗血症の1つの出所が肺炎としてコードされるかどうか確認した。他の感染部位もまた存在し得た。化学的な後遺症から感染性のものであることを区別することが困難なために、吸引性肺炎を有する患者は、含めなかった。次いで肺炎を有すると同定した患者を、培養陽性(菌またはグラム染色のような感染の任意の証拠)または培養陰性(陰性培養または培養せず)であるとして分類した。300mM L-アルギニン、pH 5.5の20mMクエン酸ナトリウム、浸透圧が560±110mOsmを含む緩衝液中に処方された、E.coli内で発現した非グリコシル化型ala-TFPIの調製物を、0.025mg/kg/時間の投薬量で、連続静脈内注入(confusion)によって、患者を処置した。プラセボは、ala-TFPIを含まない同一の緩衝液からなり、そして治験薬と同一の割合で注入した。これらの分析の結果、培養陽性肺炎を有する患者においてala-TFPI処置から正の効果があることが実証される(表1)。感染源の証拠のない患者は、負の効果を実証した。

【0077】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 肺炎状態による死亡率

$INR \geq 1.2$	全体		
	プラセボ	TFPI	p=
肺炎培養陽性			
(N=)	236	268	
死亡率 %	39.8%	31.3%	0.05
肺炎培養陰性			
(N=)	118	122	
死亡率 %	30.5%	45.1%	0.02

10

【 0 0 7 8 】

【表 2】

表 2. 低INR肺炎状態による死亡率

$INR < 1.2$	全体		
	プラセボ	TFPI	p=
肺炎培養陽性			
(N=)	33	22	
死亡率 %	30.3%	13.6%	0.15
肺炎培養陰性			
(N=)	25	23	
死亡率 %	32.0%	8.7%	0.08

20

30

肺炎培養陰性の非ヘパリングループにおける被験者数が、比較的少ないことに注意されるべきであるにもかかわらず、高INR培養陰性グループにおける増加した死亡率は、さらにヘパリンを投与した、または投与していない患者集団に存在するようであった（表3）。強い正の処置効果が、培養陽性/非ヘパリンコホートにおいて観察された。

【 0 0 7 9 】

【表 3】

表3. 肺炎状態およびヘパリンによる死亡率

INR ≥ 1.2	肺炎培養陽性			肺炎培養陰性		
	プラセボ	TFPI	p=	プラセボ	TFPI	p=
ベースライン時または投与中のヘパリン						
(N=)	160	187		87	85	
死亡率 %	32.5%	31.6%	0.84	36.8%	56.5%	0.01
ベースライン時または投与中の無ヘパリン						
(N=)	76	81		31	37	
死亡率 %	55.3%	30.9%	0.002	32.3%	48.6%	0.17

10

(実施例2: ベースライン重症度変数の調査)

多くのベースライン重症度変数を、観察された結果を説明し得る、グループの不均衡があるかどうかを決定するために評価した。これらのデータは、培養状態に関連した結果における差違が、ベースラインの不均衡によらないことを示す。したがって、この結果は、感染した患者と感染していない患者との間の生物学的差違によるTFPI処置の差次的な効果を表すようである。TFPIで処置した肺炎培養陰性グループにおいて、重症度の指標（例えば、APACHE II値または器官機能障害値）が、プラセボに等しいか、またはより低いかのいずれかであったという事実にもかかわらず、培養陰性グループは、死亡率の中で最も高い値を実証した（表4）。

20

【0080】

【表4】

表4. 肺炎状態によるベースライン重症度

INR ≥ 1.2	肺炎培養陽性		肺炎培養陰性	
	プラセボ	TFPI	プラセボ	TFPI
N=	236	268	118	122
死亡率 %	39.8%	31.3%	30.5%	45.1%
APACHE II	25.8	25.9	24.3	25.2
INR	1.53	1.50	1.52	1.45
平均器官機能障害	3.0	3.0	3.0	2.9
CV-低血圧症	79%	74%	73%	72%
アシドーシス	66%	66%	64%	58%
乏尿症	42%	48%	47%	49%
肺機能障害	93%	91%	91%	90%
血小板減少症	20%	23%	22%	16%

30

40

IL-6は、敗血症において早期に上昇し、炎症性応答の強度を反映し、そして結果に関連する、炎症性サイトカインである。ベースライン時では、肺炎を有するが感染の証拠はないと臨床的に同定された患者において、IL-6レベルが低い（表5）。これは、肺炎の感染源が実証された患者と明らかな感染源のない患者との間に生物学的な差違があるこ

50

とを示唆する。逆説的に、培養陰性TFPIグループは、最も低いベースラインIL-6レベルを有するが、最も高い死亡率を有する。敗血症の集団においては、IL-6レベルは、経時的に減少する。IL-6の減少率は、TFPIで処置した肺炎培養陰性被験者において減少する(表5)。これは、TFPIの生物学的効果が、感染している患者と感染していない患者とにおいて異なり得ることを示唆する。

【0081】

【表5】

表5. 肺炎状態によるIL-6

INR ≥ 1.2 肺炎	ベースライン			6時間(% Δ*)			24時間(% Δ*)			96時間(% Δ*)		
	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=
培養陽性 (n=493)	494	489	0.96	-25%	-27%	0.75	-57%	-63%	0.26	-83%	-84%	0.69
培養陰性 (n=236)	300	195	0.11	-21%	-8%	0.08	-54%	-32%	0.03	-98%	-97%	0.06

* % Δ = ベースラインからの変化% (相乗平均)

10

(実施例3: 感染の実証の型による重症な肺炎患者の分析)

上で議論したように、ala-TFPI処置による全体的な利点を、最も高い感染の確実度を有する患者(すなわち、陽性血液培養の患者)において観察した。感染の実証の型による重症な肺炎患者の分析において、ala-TFPI処置の利点は、陽性血液培養を有する被験者および他の証拠を有する被験者の両方において見られた(表6)。この効果は、菌血症グループ(すなわち、感染の最も高い可能性または最も実証できる感染源を有するグループ)において最も強かった。

20

【0082】

【表6】

表6. 培養状態および肺炎状態による死亡率

INR ≥ 1.2	血液培養陽性			他の培養陽性			培養陰性 / ND		
	プラセボ	TFPI	p=	プラセボ	TFPI	p=	プラセボ	TFPI	p=
肺炎									
(N=)	80	107		156	161		110	110	
死亡率 %	38.8%	26.2%	0.07	40.4%	34.8%	0.30	30.9%	46.4%	0.02

30

前に示したように、感染の実証を有する(血液+「他」)患者は、ヘパリンの非存在においてTFPI処置が有益であった。この結果は、ほぼ、肺炎グループから得られる利点のためである(表7)。この所見は、内因性抗凝血剤の利点が、重症な肺感染症を有する患者において最も大きいということを示すと思われる。

40

【0083】

【表7】

表 7. 感染状態、肺炎状態およびヘパリン使用による死亡率

INR ≥ 1.2	ヘパリン			無ヘパリン		
	プラセボ	TFPI	p=	プラセボ	TFPI	p=
実証された感染(血液+「他」)						
N=	433	442		211	207	
死亡率 %	31.4%	31.9%	0.89	43.1%	32.4%	0.02
肺炎(培養陽性)						
N=	160	187		76	81	
死亡率 %	32.5%	31.6%	0.84	55.3%	30.9%	0.002
肺炎であると実証されなかった感染(肺炎でないと実証された)						
N=	273	255		135	126	
死亡率 %	30.8%	32.2%	0.73	36.3%	33.3%	0.62

10

不均一性をさらに限定するために、さらなる治験を市中肺炎(CAP)に集中させ得る。入院中の間に肺炎を発症する患者(院内肺炎)は、病原性生物が入植し、他の肺性障害を有する可能性があり、このことは、感染性肺炎の診断をより難しくする。さらに、CAPを有する患者は、院内肺炎を有する患者よりもヘパリンにさらされた可能性が低い。処置前の病院での滞在の長さによってデータを分析する場合、2日以下の入院の培養陽性患者(市中感染)と2日より長く入院した培養陽性患者(院内感染)とについて、同様の利点であったことが注目された。培養陰性患者における負の効果が、主に院内感染グループにおいて、見られた(表8)。

20

【0084】

【表8】

表 8. 肺炎状態による死亡率および入院からの時間

30

INR ≥ 1.2	肺炎培養陽性			肺炎培養陰性		
	プラセボ	TFPI	p=	プラセボ	TFPI	p=
市中感染 (≤ 2 日間)						
(N=)	121	143		61	52	
死亡率 %	38.8%	29.4%	0.10	27.9%	30.8%	0.74
院内感染 (> 2 日間)						
(N=)	115	125		57	70	
死亡率 %	40.9%	33.6%	0.24	33.3%	55.7%	0.01

40

本発明は、特定の実施形態を参照にして記載されている。しかし、この出願は、添付の特許請求の範囲の意図および範囲から外れずに、当業者によってなされ得る変更および代替を網羅することを意図する。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/032904 A2

- (51) International Patent Classification: A61K (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/32624
- (22) International Filing Date: 15 October 2002 (15.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/328,806 15 October 2001 (15.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2917 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): CREASEY, Abia, A. [US/US]; 8 Langdon Court, Piedmont, CA 94611 (US).
- (74) Agent: GUTH, Joseph, H.; Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2917 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EL, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/032904 A2

(54) Title: TREATMENT OF SEVERE PNEUMONIA BY ADMINISTRATION OF TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR (TFPI)

(57) Abstract: Methods for prophylactically or therapeutically treating severe pneumonia involve administration of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) or a TFPI analog to patients suffering from or at risk of developing this condition. The methods involve the use of continuous intravenous infusion of TFPI or a TFPI analog, preferably at low doses to avoid adverse side effects.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

**TREATMENT OF SEVERE PNEUMONIA BY ADMINISTRATION OF
TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR (TFPI)**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

- [01] This application claims priority to Provisional Application Serial No. 60/328,806 filed October 15, 2001, hereby incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

- [02] The present invention relates to a method for therapeutically treating severe pneumonia. More specifically, it relates to administering a tissue factor pathway inhibitor protein to attenuate exuberant or amplified physiological pathways associated with severe pneumonia.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- [03] Pneumonia results from an acute infection of one or more functional elements of the lung, including alveolar spaces and interstitial tissue. In the USA, about 2 million people develop pneumonia each year, and 40,000 to 70,000 of these people die. Pneumonia ranks sixth among all disease categories as a cause of death and is the most common lethal nosocomial (hospital-acquired) infection. Community-acquired pneumonia (CAP) has a significant impact on health care costs in the United States, accounting for an estimated \$14 billion per year in direct costs and \$9 billion in lost wages. (Lynch JP, Martinez FJ. *Community-acquired pneumonia*. Curr Opin Pulm Med. 1998; 4:162-172). In developing countries, lower respiratory tract infections typically are either the major cause of death or rank second only to infectious diarrhea. (*The Merck Manual*, Sec. 6, Ch. 73, Pneumonia, 2000).
- [04] The condition known as "severe pneumonia" is characterized according to guidelines set forth by various organizations, including the American Thoracic Society (ATS). (Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1730-1754). For example, the ATS requires at least one

WO 03/032904

PCT/US02/32624

major criterion, such as a need for mechanical ventilation or septic shock, in addition to other criteria for a diagnosis of severe pneumonia. Generally, severe pneumonia can result from acute lung disease, lung inflammatory disease, or any perturbations in lung function due to factors such as inflammation or coagulation. A diagnosis of severe CAP is based on patient being admitted to an ICU specifically for pneumonia. Epidemiologically, this patient population comprises approximately 10% of all ICU admissions. Patients in the ICU with pneumonia have the highest mortality of all CAP patients (30% to 40%) compared with less than 15% for general hospitalized patients with CAP.

- [05] Each year in the United States, community-acquired pneumonia (CAP) is diagnosed in approximately 4 million adults, with as many as 600,000 requiring hospitalization. Fine *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 243-50, 1997. Overall, the incidence of CAP increases with age, with the greatest prevalence found in those aged 65 years and older. Marston *et al.*, *Arch Intern Med.* 1997;157:1709-1718. The incidence is also increased in patients with comorbidities, such as chronic obstructive pulmonary disease, asthma, diabetes mellitus, alcoholism, immunosuppression, renal insufficiency, chronic liver disease, and cardiac disease. Marrie, *Curr Opin Pulm Med.* 1996;2:192-197 ; Niedermann *et al.*, *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1418-1426.
- [06] Pneumonia is the leading cause of death from infection in the United States and the sixth leading cause of death overall. The pneumonia-related mortality rate increased by 22% from 1979 to 1992, with elderly patients (65 years and older) accounting for 89% of all pneumonia-related deaths in 1992. See Pneumonia and influenza death rates -- United States, 1979-1994 [published correction appears in *MMWR.* 1995;44:782]. *MMWR.* 1995;44:535-537. Fine and colleagues (1997) reported that certain coexisting illnesses (neoplastic disease, congestive heart failure (CHF) cerebrovascular disease, renal disease, and liver disease) and certain physical examination findings (altered mental status, increased heart rate, increased respiratory rate, decreased systolic blood pressure, and abnormally low or elevated temperatures) are also associated with increased CAP-related mortality. In addition, CAP has a significant impact on health care costs in the United

WO 03/032904

PCT/US02/32624

States, accounting for an estimated \$14 billion per year in direct costs and \$9 billion in lost wages. Lynch & Martinez, *Curr Opin Pulm Med.* 1998;4:162-172.

- [07] Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is a protein and a serine protease inhibitor present in mammalian blood plasma. Thomas, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 81, 26 (1947); Schneider, *Am. J. Physiol.* 149, 123 (1947); Broze & Miletich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1886 (1987). TFPI is also known as tissue factor inhibitor, tissue thromboplastin inhibitor, Factor III inhibitor, extrinsic pathway inhibitor (EPI), and lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI). The name "tissue factor pathway inhibitor" (TFPI) was accepted by the International Society on Thrombosis and Hemostasis on June 30, 1991.
- [08] Blood coagulation activation is the conversion of fluid blood to a solid gel or clot. In addition, consumption of the coagulation proteases leads to excessive bleeding. The main event is the conversion of soluble fibrinogen to insoluble strands of fibrin, although fibrin itself forms only 0.15% of the total blood clot. This conversion is the last step in a complex enzyme cascade. The components (factors) are present as zymogens, inactive precursors of proteolytic enzymes, which are converted into active enzymes by proteolytic cleavage at specific sites. Activation of a small amount of one factor catalyzes the formation of larger amounts of the next, and so on, resulting in an amplification that results in an extremely rapid formation of fibrin.
- [09] Coagulation is believed to be initiated by vessel damage which exposes factor VIIa to tissue factor (TF), which is expressed on cells beneath the endothelium. The factor VIIa-TF complex cleaves factor X to factor Xa and cleaves factor IX to factor IXa. TFPI binds to both factor VIIa and factor Xa. The complex formed between TFPI, factor VIIa (with its bound TF), and factor Xa inhibits further formation of factors Xa and IXa, required for sustained hemostasis. Broze, Jr., *Ann. Rev. Med.* 46:103 (1995).
- [10] Activation of the coagulation cascade by bacterial products, including endotoxins, introduced directly into the bloodstream can result in extensive fibrin deposition on

WO 03/032904

PCT/US02/32624

arterial surfaces, as well as depletion of fibrinogen, prothrombin, factors V and VIII, and platelets. In addition, the fibrinolytic system is stimulated, resulting in further formation of fibrin degradation products.

- [11] At the same time as coagulation activation is apparently initiated by bacterial products (e.g., endotoxin), contravening mechanisms also appear to be activated by clotting, namely activation of the fibrinolytic system. Activated Factor XIII converts plasminogen pro-activator, to plasminogen activator that subsequently converts plasminogen to plasmin, thereby mediating clot lysis. The activation of plasma fibrinolytic systems may therefore also contribute to bleeding tendencies.
- [12] Endotoxemia is associated with an increase in the circulating levels of tissue plasminogen activator inhibitor (PAI). This inhibitor rapidly inactivates tissue plasminogen activator (TPA), thereby hindering its ability to promote fibrinolysis through activation of plasminogen to plasmin. Impairment of fibrinolysis may cause fibrin deposition in blood vessels, thus contributing to the DIC associated with septic shock.
- [13] Efforts are ongoing to identify satisfactory interventions for the prevention or treatment of severe pneumonia and associated coagulopathies. An agent that interrupts the coagulation pathway is not necessarily effective as a therapeutic or a prophylactic treatment of severe pneumonia. For example, heparin is a commonly used anticoagulant. However, management of the use of heparin has been difficult because heparin can induce excessive bleeding and has been found to attenuate coagulation abnormalities but not offer a survival benefit. See for example, Aoki *et al.*, "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). Several clinical trials, mainly in meningococcal endotoxemia where fulminating DIC is a prominent feature, have failed to demonstrate reduction of mortality in sepsis by heparin treatment. See, for example, Corrigan *et al.*, "Heparin Therapy in Septacemia with Disseminated Intravascular Coagulation. Effect on Mortality and on Correction of Hemostatic Defects," *N. Engl. J. Med.*, 283:778-782 (1970); Lasch *et al.*, Heparin

WO 03/032904

PCT/US02/32624

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).

- [14] Administration of recombinant human ala-TFPI (a TFPI analog) has been shown to improve survival rates in animal models of sepsis. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 6,063,764. As an endogenous protein, TFPI is well tolerated. TFPI administration by intravenous infusion or subcutaneous injection has been shown to reduce clotting ability, which is manifested as increased prothrombin time (PT). In studies of animals and humans, prolongations of PT were linearly related to the increase of plasma TFPI. A.A. Creasey, *Sepsis* 3:173 (1999).
- [15] There remains a need in the art for treatment approaches that will inhibit the lethal effects of severe pneumonia and simultaneously minimize potentially serious side effects.

SUMMARY OF THE INVENTION

- [16] One embodiment of the present invention is a method of preventing or treating severe pneumonia comprising administering TFPI or a TFPI analog to a patient who has or is at risk of developing severe pneumonia. In some embodiments, the patient has a demonstrable infection.
- [17] Another embodiment of the present invention is a method for treating severe pneumonia, comprising administering to a patient a continuous intravenous infusion of an agent selected from the group consisting of TFPI or a TFPI analog. In some embodiments, the patient has a demonstrable infection.
- [18] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI or TFPI analog is administered by continuous intravenous infusion at a dose rate equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate of less than about 0.66 mg/kg/hr. In a preferred embodiment, said dose rate is equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate from about 0.00025 to about 0.050 mg/kg/hr. In a more preferred

WO 03/032904

PCT/US02/32624

embodiment said dose rate is equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate from about 0.010 to about 0.045 mg/kg/hr. In a still more preferred embodiment, said TFPI or said TFPI analog is administered at a dose rate equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate of about 0.025 mg/kg/hr. In another preferred embodiment, said dose rate is administered to provide a total dose equivalent to administration of reference ala-TFPI at a total dose from about 0.024 to about 4.8 mg/kg. In another preferred embodiment, said dose rate is administered to provide a daily dose equivalent to administration of reference ala-TFPI at a daily dose of at least about 0.006 mg/kg and less than about 1.2 mg/kg.

- [19] Other embodiments include any of the above embodiments, wherein said TFPI or TFPI analog is administered for at least 72 hours. In a preferred embodiment, said TFPI or TFPI analog is administered for at least 96 hours.
- [20] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
- [21] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI analog comprises a first Kunitz domain consisting of amino acids 19-89 of SEQ ID NO:1. In a preferred embodiment, said TFPI analog further comprises a second Kunitz domain consisting of amino acids 90-160 of SEQ ID NO:1.
- [22] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI analog comprises amino acids 1-160 of SEQ ID NO:1 or wherein said TFPI analog comprises a second Kunitz domain consisting of amino acids 90-160 of SEQ ID NO:1.
- [23] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI or TFPI analog is prepared from a lyophilized composition comprising TFPI or a TFPI analog.
- [24] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI or TFPI analog is administered as a formulation comprising arginine.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

- [25] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI or TFPI analog is administered as a formulation comprising citrate.
- [26] Other embodiments include any of the above embodiments wherein said TFPI or TFPI analog has a concentration of about 0.15 mg/ml in a formulation comprising about 300 mM arginine hydrochloride and about 20 mM sodium citrate and having a pH of about 5.5.
- [27] Other embodiments include any of the above embodiments, further comprising administering at the same time as, or within 24 hours of administering said TFPI or TFPI analog, an additional agent selected from the group consisting of an antibiotic, an antibody, an endotoxin antagonist, a tissue factor analog having anticoagulant activity, an immunostimulant, a cell adhesion blocker, heparin, BPI protein, an IL-1 antagonist, pafase (PAF enzyme inhibitor), a TNF inhibitor, an IL-6 inhibitor, and an inhibitor of complement. In a preferred embodiment, said additional agent is an antibody that binds specifically to an antigen selected from the group consisting of TNF, IL-6, and M-CSF.
- [28] Further embodiments of the present invention are apparent in view of the below-referenced drawings in conjunction with the detailed description.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- [29] Administration of TFPI or analogs of TFPI is effective in the prophylaxis and treatment of severe pneumonia. Continuous low dosage administration of TFPI or analogs of TFPI (hereinafter "low dose TFPI administration") also is effective in the prophylaxis and treatment of severe pneumonia. TFPI or TFPI analog administration, particularly low dose administration, inhibits or attenuates acute or chronic inflammation, particularly severe pneumonia. When low dose TFPI administration is continued for at least three days, the risk of death from severe pneumonia is reduced, while the rate of complications from adverse side effects, particularly bleeding disorders, may be minimized. A further advantage of low dose TFPI administration is the avoidance of tolerance effects that, at

WO 03/032904

PCT/US02/32624

sufficiently high doses, can reduce the plasma concentration of TFPI. Tolerance effects are stimulated half-maximally at a plasma TFPI concentration of about 850 ng/ml, whereas with low dose TFPI administration plasma levels generally stay below 500 ng/ml. Low dose TFPI administration generally is carried out by continuous intravenous infusion of TFPI or an analog of TFPI.

TFPI and TFPI Analogs

- [30] "TFPI" as used herein refers to the mature serum glycoprotein having the 276 amino acid residue sequence shown in SEQ ID NO:1 and a molecular weight of about 38,000 Daltons. It is a natural inhibitor of tissue factor activity and thus coagulation activation. U.S. Pat. No. 5,110,730 describes tissue factor (TF), and U.S. Pat. No. 5,106,833 describes TFPI. The cloning of the TFPI cDNA is described in Wun *et al.*, U.S. Pat. No. 4,966,852. TFPI is a protease inhibitor and has 3 Kunitz domains, two of which are known to interact with factors VII and Xa respectively. The function of the third domain remains unknown. TFPI is believed to function *in vivo* to limit the initiation of coagulation by forming an inert, quaternary factor X_a:TFPI:factor VII_a:tissue factor complex. See reviews by Rapaport, Blood 73:359-365 (1989) and Broze *et al.*, Biochemistry 29:7539-7546 (1990). Many of the structural features of TFPI can be deduced from its homology with other well-studied protease inhibitors. TFPI is not an enzyme, so it probably inhibits its protease target in a stoichiometric manner, *i.e.*, one of the Kunitz domains of TFPI inhibits one protease molecule. Preferably, Kunitz domains 1 and/or 2 will be present in TFPI molecules of the instant invention. The function of Kunitz domain 3 is unknown.
- [31] A "TFPI analog" is a derivative of TFPI modified with one or more amino acid additions or substitutions (generally conservative in nature), one or more amino acid deletions (*e.g.*, TFPI fragments), or the addition of one or more chemical moieties to one or more amino acids, so long as the modifications do not destroy TFPI biological activity. Methods for making polypeptide analogs are known in the art and are described further below. A preferred TFPI analog is N-L-alanyl-TFPI (ala-TFPI), whose amino acid sequence is

WO 03/032904

PCT/US02/32624

shown in SEQ ID NO:2. TFPI analogs possess some measure of the activity of TFPI as determined by a bioactivity assay as described below. A preferred bioactivity assay for TFPI and analogs is the prothrombin time (PT) assay (see below).

- [32] TFPI and TFPI analogs can be either glycosylated or non-glycosylated. Analogs of TFPI are described in U.S. Pat. No. 5,106,833. Ala-TFPI is a TFPI analog that is also known under the international drug name "tifacogin." Ala-TFPI includes the entire amino acid sequence of mature, full-length human TFPI plus an additional alanine residue at the amino terminus. The amino terminal alanine residue of ala-TFPI was engineered into the TFPI sequence to improve *E. coli* expression and to effect cleavage of what would otherwise be an amino terminal methionine residue. See U.S. Patent 5,212,091.
- [33] Particularly preferred TFPI analogs include substitutions that are conservative in nature, *i.e.*, those substitutions that take place within a family of amino acids that are related in their side chains. Specifically, amino acids are generally divided into four families: (1) acidic -- aspartate and glutamate; (2) basic -- lysine, arginine, histidine; (3) non-polar -- alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged polar -- glycine, asparagine, glutamine, cysteine, serine, threonine, and tyrosine. Phenylalanine, tryptophan, and tyrosine are sometimes classified as aromatic amino acids. For example, it is reasonably predictable that an isolated replacement of leucine with isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, a threonine with a serine, or a similar conservative replacement of an amino acid with a structurally related amino acid, will not have a major effect on the biological activity. For example, the polypeptide of interest may include up to about 1-70 conservative or non-conservative amino acid substitutions, such as 1, 2, 3, 4, 5, 6-50, 15-25, 5-10, or any integer from 1 to 70, so long as the desired function of the molecule remains intact. One of skill in the art may readily determine regions of the molecule of interest that can be modified with a reasonable likelihood of retaining biological activity as defined herein.
- [34] "Homology" refers to the percent similarity between two polynucleotide or two polypeptide moieties. Two polypeptide sequences are "substantially homologous" to

WO 03/032904

PCT/US02/32624

each other when the sequences exhibit at least about 50%, preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%-85%, preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%-98% sequence homology, or any percent homology between the specified ranges, over a defined length of the molecules. As used herein, "substantially homologous" also refers to sequences showing complete identity to the specified polypeptide sequence.

- [35] In general, "identity" refers to an exact amino acid-to-amino acid correspondence of two polypeptide sequences, respectively. Percent identity can be determined by a direct comparison of the sequence information between two molecules by aligning the sequences, counting the exact number of matches between the two aligned sequences, dividing by the length of the shorter sequence, and multiplying the result by 100.
- [36] Preferably, naturally or non-naturally occurring TFPI analogs have amino acid sequences which are at least 70%, 80%, 85%, 90% or 95% or more homologous to TFPI derived from SEQ ID NO:1. More preferably, the molecules are 98% or 99% homologous. Percent homology is determined using the Smith-Waterman homology search algorithm using an affine gap search with a gap open penalty of 12 and a gap extension penalty of 2, and a BLOSUM matrix of 62. The Smith-Waterman homology search algorithm is taught in Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482-489 (1981).
- [37] The biological activity of TFPI and TFPI analogs can be determined by the prothrombin assay. Suitable prothrombin assays are described in U.S. Patent 5,888,968 and in WO 96/40784. Briefly, prothrombin time can be determined using a coagulometer (*e.g.*, Coag-A-Mate MTX II from Organon Teknika). A suitable assay buffer is 100 mM NaCl, 50 mM Tris adjusted to pH 7.5, containing 1 mg/ml bovine serum albumin. Additional reagents required are normal human plasma (*e.g.*, "Verify 1" by Organon Teknika), thromboplastin reagent (*e.g.*, "Simplastin Excel" by Organon Teknika), and TFPI standard solution (*e.g.*, 20 µg of 100% pure ala-TFPI (or equivalent thereof) per ml of assay buffer). A standard curve is obtained by analyzing the coagulation time of a series of dilutions of the TFPI standard solution, *e.g.*, to final concentrations ranging from 1 to 5

WO 03/032904

PCT/US02/32624

µg/ml. For the determination of clotting time, the sample or TFPI standard is first diluted into the assay buffer. Then normal human plasma is added. The clotting reaction is started by the addition of thromboplastin reagent. The instrument then records the clotting time. A linear TFPI standard curve is obtained from a plot of log clotting time vs. log TFPI concentration. The standard curve is adjusted based on the purity of the TFPI standard to correspond to the equivalent TFPI concentration of a 100% pure standard. For example, if the standard is a preparation of ala-TFPI that is 97% biochemically pure (*i.e.*, it contains 3% by weight of molecular species without biological activity of TFPI), then the concentration of each dilution of the standard is multiplied by 0.97 to give the actual concentration of TFPI. Thus, a TFPI standard that is 1.0 µg/ml based on the actual weight per ml of a preparation that is 97% pure will be equivalent to, and treated as, a concentration of 1.0×0.97 , or 0.97 µg/ml.

Obtaining TFPI and TFPI analogs

- [38] TFPI and analogs of TFPI used in the methods of the invention can be isolated and purified from cells or tissues, chemically synthesized, or produced recombinantly in either prokaryotic or eukaryotic cells.
- [39] TFPI can be isolated by several methods. For example, cells that secrete TFPI include aged endothelial cells, young endothelial cells that have been treated with TNF for about 3 to 4 days, hepatocytes, and hepatoma cells. TFPI can be purified by conventional methods, including the chromatographic methods of Pedersen *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 16786-93, Novotny *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* 264, 18832-37, Novotny *et al.*, 1991, *Blood* 78, 394-400, Wun *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 16096-101, and Broze *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1886-90. TFPI appears in the bloodstream and can be purified from blood, *see* Pedersen *et al.*, 1990.
- [40] A TFPI or TFPI variant can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-

WO 03/032904

PCT/US02/32624

204, 1995). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Optionally, fragments of TFPI or TFPI variants can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

- [41] TFPI and TFPI analogs may be produced recombinantly as shown in U.S. Pat. No. 4,966,852. For example, the cDNA for the desired protein can be incorporated into a plasmid for expression in prokaryotes or eukaryotes. U.S. Pat. No. 4,847,201 provides details for transforming microorganisms with specific DNA sequences and expressing them. There are many other references known to those of ordinary skill in the art that provide details on expression of proteins using microorganisms. Many of those are cited in U.S. Pat. No. 4,847,201, such as Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press.
- [42] A variety of techniques are available for transforming microorganisms and using them to express TFPI and TFPI analogs. The following are merely examples of possible approaches. TFPI DNA sequences must be isolated and connected to the appropriate control sequences. TFPI DNA sequences are shown in U.S. Pat. No. 4,966,852 and can be incorporated into a plasmid, such as pUNC13 or pBR3822, which are commercially available from companies such as Boehringer-Mannheim. Once the TFPI DNA is inserted into a vector, it can be cloned into a suitable host. The DNA can be amplified by techniques such as those shown in U.S. Pat. No. 4,683,202 to Mullis and U.S. Pat. No. 4,683,195 to Mullis *et al.* TFPI cDNA may be obtained by inducing cells, such as hepatoma cells (such as HepG2 and SKHep) to make TFPI mRNA, then identifying and isolating the mRNA and reverse transcribing it to obtain cDNA for TFPI. After the expression vector is transformed into a host such as *E. coli*, the bacteria may be fermented and the protein expressed. Bacteria are preferred prokaryotic microorganisms and *E. coli* is especially preferred. A preferred microorganism useful in the present invention is *E. coli* K-12, strain MM294 deposited with the ATCC on Feb. 14, 1984 (Accession No. 39607), under the provisions of the Budapest Treaty.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

- [43] It is also, of course, possible to express genes encoding polypeptides in eukaryotic host cell cultures derived from multicellular organisms. *See*, for example, Tissue Culture, 1973, Cruz and Patterson, eds., Academic Press. Useful mammalian cell lines include murine myelomas NS1, VERO, HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, COS, C127, Hep G2, and SK Hep. TFPI and TFPI analogs can also be expressed in baculovirus-infected insect cells (*see also* U.S. Pat. No. 4,847,201, referred to above). *See also* Pedersen *et al.*, 1990, *J. of Biological Chemistry*, 265:16786-16793. Expression vectors for eukaryotic cells ordinarily include promoters and control sequences compatible with mammalian cells such as, for example, the commonly used early and later promoters from Simian Virus 40 (SV40) (Fiers, *et al.*, 1978, *Nature*, 273:113), or other viral promoters such as those derived from polyoma, Adenovirus 2, bovine papilloma virus, or avian sarcoma viruses, or immunoglobulin promoters and heat shock promoters. General aspects of mammalian cell host system transformations have been described by Axel, U.S. Pat. No. 4,399,216. It now appears also that "enhancer" regions are important in optimizing expression; these are, generally, sequences found upstream of the promoter region. Origins of replication may be obtained, if needed, from viral sources. However, integration into the chromosome is a common mechanism for DNA replication in eukaryotes. Plant cells are also now available as hosts, and control sequences compatible with plant cells such as the nopaline synthase promoter and polyadenylation signal sequences (Depicker, A., *et al.*, 1982, *J. Mol. Appl. Gen.*, 1:561) are available. Methods and vectors for transformation of plant cells have been disclosed in WO 85/04899.
- [44] Methods which can be used for purification of TFPI and TFPI analogs expressed in mammalian cells include sequential application of heparin-Sepharose, MonoQ, MonoS, and reverse phase HPLC chromatography. *See* Pedersen *et al.*, *supra*; Novotny *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* 264:18832-18837; Novotny *et al.*, 1991, *Blood*, 78:394-400; Wun *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265:16096-16101; Broze *et al.*, 1987, *PNAS (USA)*, 84:1886-1890; U.S. Pat. No. 5,106,833; and U.S. Patent No. 5,466,783. These references describe various methods for purifying mammalian produced TFPI.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

- [45] TFPI also can be expressed as a recombinant glycosylated protein using mammalian cell hosts, such as mouse C127 cells (Day *et al.*, *Blood* 76, 1538-45, 1990), baby hamster kidney cells (Pedersen *et al.*, 1990), Chinese hamster ovary cells, and human SK hepatoma cells. C127 TFPI has been used in animal studies and shown to be effective in the inhibition of tissue factor-induced intravascular coagulation in rabbits (Day *et al.*, *supra*), in the prevention of arterial reocclusion after thrombolysis in dogs (Haskel *et al.*, *Circulation* 84:821-827 (1991)), and in reduction of mortality in an *E. coli* sepsis model in baboons (Creasey *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:2850 (1993)). Ala-TFPI can be expressed as a recombinant non-glycosylated protein using *E. coli* host cells. Methods have been described which yield a highly active ala-TFPI by *in vitro* refolding of the recombinant protein produced in *E. coli*. See, e.g., WO 96/40784.
- [46] TFPI and TFPI analogs also can be produced in bacteria or yeast and subsequently purified. Generally, the procedures shown in U.S. Pat. Nos. 5,212,091; 6,063,764; and 6,103,500 or WO 96/40784 can be employed. Ala-TFPI and other TFPI analogs can be purified, solubilized, and refolded according to WO 96/40784 and Gustafson *et al.*, *Prot. Express. Pur.* 5:233 (1994), which are incorporated herein by reference. For example, when prepared according to Example 9 of WO 96/40784, preparations of ala-TFPI may be obtained that contain from about 85% to 90% of the total protein by weight as mature, properly-folded, biologically active ala-TFPI, about 10% to 15% of which has one or more oxidized methionine residues. These oxidized forms have biological activity that is equivalent to the biological activity of underivatized ala-TFPI, as determined by prothrombin assay, and are expected to be active in the invention disclosed herein. The remaining material comprises various modified forms of ala-TFPI, including dimerized, aggregated, and acetylated forms.
- [47] TFPI and TFPI analogs can have a significant number of cysteine residues, and the procedure shown in U.S. Pat. No. 4,929,700 is relevant to TFPI refolding. TFPI and analogs can be purified from the buffer solution by various chromatographic methods, such as those mentioned above. If desired, the methods shown in U.S. Pat. No. 4,929,700

WO 03/032904

PCT/US02/32624

may be employed. Any method may be employed to purify TFPI and TFPI analogs that results in a degree of purity and a level of activity suitable for administration to humans.

Therapeutic methods and compositions

- [48] Generally, TFPI and TFPI analogs are useful to treat or prevent those diseases that occur due to the up-regulation of tissue factor expression and hence TF activity brought on by TNF, IL-1 or other cytokines. TFPI administration, and particularly low dose TFPI administration, may lower the concentration of cytokines such as IL-6 in a patient. Low dose TFPI administration is useful for treating inflammation and coagulation abnormalities generally, including both acute and chronic inflammatory conditions such as severe pneumonia.
- [49] "Severe pneumonia" is defined according to the guidelines set forth by the American Thoracic Society. Specifically, severe pneumonia requires a diagnosis of pneumonia and the existence of either a) one of two major criteria, b) two of three minor criteria, or c) two of the four criteria from the British Thoracic Society (Thorax 2001; 56 [suppl IV]:1-64). The major criteria are 1) need for mechanical ventilation and 2) septic shock or need for pressors for >4 hours. The minor criteria are 1) systolic blood pressure ≤ 90 mmHg, 2) multi-lobar pneumonia, and 3) hypoxemia criterion ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) < 250 . The criteria from the British Thoracic Society are 1) respiratory rate ≥ 30 breaths/minute, 2) diastolic blood pressure ≤ 60 mmHg, 3) blood urea nitrogen (BUN) > 7.0 mM (> 19.6 mg/dL) and 4) confusion. As is understood in the art, the hypoxemia criterion ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) refers to the partial pressure of arterial oxygen to the fraction of inspired oxygen and indicates the level of impairment of gas exchange.
- [50] Preferably, patients with severe pneumonia have an infection demonstrable by any means known in the art. These methods include, but are not limited to, detection of a pathogenic organism in a culture of blood or other normally sterile body fluid or tissue by, for example, GRAM stain, culture, histochemical staining, immunochemical assay, or nucleic acid assays. A demonstrable infection also can be evidenced by a chest

WO 03/032904

PCT/US02/32624

radiograph consistent with a diagnosis of pneumonia that constitutes the reason for systemic anti-infective therapy, as well as any clinical symptom of infection, including, but not limited to, an increase in respiratory rate $\geq 30/\text{min}$ or $\text{PaCO}_2/\text{FiO}_2 < 250$, a decrease in blood pressure, and an increase in body temperature.

Formulations of TFPI and TFPI Analogs

- [51] Formulations of TFPI and TFPI analogs preferably are administered by intravenous infusions. Essentially continuous intravenous infusion is preferred. Methods to accomplish this administration are known to those of ordinary skill in the art. Infusion can be performed via a central line or a peripheral line. While large fluctuations in the dose rate are to be avoided, short-term deviations from the dose rates of the invention are acceptable provided the resulting plasma level of administered TFPI is within 20% of that expected from a continuous infusion at a constant dose rate according to the preferred embodiments of invention.
- [52] Before administration to patients, formulators may be added to TFPI and TFPI analogs. A liquid formulation is preferred. TFPI and TFPI analogs may be formulated at different concentrations, using different formulators, and at any physiologically suitable pH compatible with the route of administration, solubility, and stability of the TFPI protein. A preferred formulation for intravenous infusion includes ala-TFPI at up to about 0.6 mg/ml, arginine hydrochloride at up to 300 mM, and sodium citrate buffer at pH 5.0-6.0. Certain solutes such as arginine, NaCl, sucrose, and mannitol serve to solubilize and/or stabilize ala-TFPI. See WO 96/40784. An especially preferred formulation for intravenous infusion contains about 0.15 mg/ml ala-TFPI, 300 mM arginine hydrochloride, and 20 mM sodium citrate at pH 5.5. TFPI and TFPI analogs also can be formulated at concentrations up to about 0.15 mg/ml in 150 mM NaCl and 20 mM sodium phosphate or another buffer at pH 5.5-7.2, optionally with 0.005% or 0.01% (w/v) polysorbate 80 (Tween 80). Other formulations contain up to about 0.5 mg/ml TFPI, or TFPI analog in 10 mM sodium acetate at pH 5.5 containing either 150 mM NaCl, 8% (w/v) sucrose, or 4.5% (w/v) mannitol. TFPI and TFPI analogs can also be

WO 03/032904

PCT/US02/32624

formulated at higher concentrations up to several mg/ml using high salt. For example, one formulation contains up to about 6.7 mg/ml ala-TFPI in 500 mM NaCl and 20 mM sodium phosphate at pH 7.0.

- [53] Further examples of formulants for TFPI and TFPI analogs include oils, polymers, vitamins, carbohydrates, amino acids, salts, buffers, albumin, surfactants, or bulking agents. Preferably carbohydrates include sugar or sugar alcohols such as mono, di, or polysaccharides, or water soluble glucans. The saccharides or glucans can include fructose, dextrose, lactose, glucose, mannose, sorbose, xylose, maltose, sucrose, dextran, pullulan, dextrin, alpha and beta cyclodextrin, soluble starch, hydroxethyl starch and carboxymethylcellulose, or mixtures thereof. Sucrose is most preferred. Sugar alcohol is defined as a C₄ to C₈ hydrocarbon having an -OH group and includes galactitol, inositol, mannitol, xylitol, sorbitol, glycerol, and arabitol. Mannitol is most preferred. These sugars or sugar alcohols mentioned above may be used individually or in combination. There is no fixed limit to the amount used as long as the sugar or sugar alcohol is soluble in the aqueous preparation. Preferably, the sugar or sugar alcohol concentration is between 1.0 w/v % and 7.0 w/v %, more preferable between 2.0 and 6.0 w/v %.
- [54] Preferably amino acids include levorotary (L) forms of carnitine, arginine, and betaine; however, other amino acids may be added. Preferred polymers include polyvinylpyrrolidone (PVP) with an average molecular weight between 2,000 and 3,000, or polyethylene glycol (PEG) with an average molecular weight between 3,000 and 5,000. It is also preferred to use a buffer in the composition to minimize pH changes in the solution before lyophilization or after reconstitution. Most any physiological buffer may be used, but citrate, phosphate, succinate, and glutamate buffers or mixtures thereof are preferred. Preferably, the concentration of the buffer is from 0.01 to 0.3 molar. Surfactants that can be added to the formulation are shown in EP Nos. 270,799 and 268,110.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

- [55] Additionally, TFPI and TFPI analogs can be chemically modified, for example by covalent conjugation to a polymer to increase its circulating half-life. Preferred polymers and methods to attach them to peptides are taught in U.S. Pat. Nos. 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285, and 4,609,546. Preferred polymers are polyoxyethylated polyols and polyethylene glycol (PEG). PEG is soluble in water at room temperature and has the general formula: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ where R can be hydrogen, or a protective group such as an alkyl or alkanol group. Preferably, the protective group has between 1 and 8 carbons, more preferably it is methyl. The symbol n is a positive integer, preferably between 1 and 1,000, more preferably between 2 and 500. The PEG has a preferred average molecular weight between 1000 and 40,000, more preferably between 2000 and 20,000, most preferably between 3,000 and 12,000. Preferably, PEG has at least one hydroxy group, more preferably it is a terminal hydroxy group. It is this hydroxy group which is preferably activated to react with a free amino group on the inhibitor. However, it will be understood that the type and amount of the reactive groups may be varied to achieve a covalently conjugated PEG/TFPI of the present invention.
- [56] Water soluble polyoxyethylated polyols are also useful in the present invention. They include polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated glycerol (POG), etc. POG is preferred. One reason is that the glycerol backbone of polyoxyethylated glycerol is the same backbone occurring naturally in, for example, animals and humans in mono-, di-, triglycerides. Therefore, this branching would not necessarily be seen as a foreign agent in the body. The POG has a preferred molecular weight in the same range as PEG. The structure for POG is shown in Knauf *et al.*, 1988, J. Bio. Chem. 263:15064-15070, and a discussion of POG-protein conjugates is found in U.S. Pat. No. 4,766,106.
- [57] After a liquid pharmaceutical composition of TFPI or a TFPI analog is prepared, it can be lyophilized to prevent degradation and to preserve sterility. Methods for lyophilizing liquid compositions are known to those of ordinary skill in the art. Just prior to use, the composition may be reconstituted with a sterile diluent (Ringer's solution, distilled water, or sterile saline, for example) that may include additional ingredients. Upon

WO 03/032904

PCT/US02/32624

reconstitution, the composition is preferably administered to subjects by continuous intravenous infusion.

Dosages of TFPI and TFPI Analogs

- [58] TFPI or TFPI analogs are administered at a concentration that is therapeutically effective to treat and prevent severe pneumonia. Such doses also are effective for other acute or chronic inflammations, and generally diseases in which cytokines upregulate tissue factor expression. To accomplish this goal, TFPI or TFPI analogs preferably are administered intravenously. Methods to accomplish this administration are known to those of ordinary skill in the art. Generally, TFPI or TFPI analogs are given at a dose between 1 $\mu\text{g/kg}$ and 20 mg/kg , more preferably between 20 $\mu\text{g/kg}$ and 15 mg/kg , most preferably between 1 and 10 mg/kg .
- [59] The above dosages are generally administered over a period of at least about 1 day, and usually several days, such that the total daily dose administered to a host in single or divided doses may be in amounts, for example, from about 2 to about 15 mg/kg body weight daily and preferably from about 4 to about 10 mg/kg . Dosage unit compositions may contain such amounts or submultiples thereof to make up the daily dose. Lower daily dosage amounts may be useful for prophylactic or other purposes, for example, from 1 $\mu\text{g/kg}$ to 2 mg/kg . The amount of active ingredient that may be combined with the carrier materials to produce a single dosage form will vary depending upon the patient treated and the particular mode of administration.
- [60] The dosage regimen is selected in accordance with a variety of factors, including the type, age, weight, sex, diet and medical condition of the patient, the severity of the condition, the route of administration, pharmacological considerations such as the activity, efficacy, pharmacokinetic and toxicology profiles, whether a drug delivery system is utilized and whether the compound is administered as part of a drug combination. Thus, the dosage regimen actually employed may vary widely and therefore may deviate from the preferred dosage regimen set forth above. Preferably, doses of

WO 03/032904

PCT/US02/32624

TFPI or TFPI analogs should not exceed a dose rate equivalent to a dose rate of ala-TFPI of about 0.66 mg/kg/hr.

Low dose administration

- [61] When TFPI or a TFPI analog is given at a dose rate equivalent to administration of ala-TFPI at a dose rate of at least about 0.00025 mg/kg/hr (0.00417 µg/kg/min) and less than about 0.050 mg/kg/hr (0.833 µg/kg/min), efficacy in treating severe pneumonia is retained and adverse side effects, such as bleeding, are minimized. For improved combined efficacy and safety, the dose rate preferably is equivalent to a dose rate of ala-TFPI of at least about 0.010 mg/kg/hr (0.167 µg/kg/min) and less than about 0.045 mg/kg/hr (0.833 µg/kg/min), or equivalent to a dose rate of ala-TFPI of at least about 0.020 mg/kg/hr and less than about 0.040 mg/kg/hr, and most preferably equivalent to a dose rate of ala-TFPI of about 0.025 mg/kg/hr (0.417 µg/kg/min)). The route of administration is generally by intravenous administration, with continuous intravenous infusion preferred. Infusion can be administered for at least about 72, 96, 120, or 240 hours. Preferably, continuous infusion is administered for 3 to 8 days, more preferably 3 to 6 days, and most preferably for about 4 days.
- [62] To administer "by continuous infusion" means that the infusion is maintained at approximately the prescribed rate without substantial interruption for most of the prescribed duration. Alternatively, intermittent intravenous infusion can be used. If intermittent infusion is used, then a time-averaged dose rate should be used which is equivalent to the dose rates described above for continuous infusion. In addition, the program of intermittent infusion must result in a maximum serum concentration not more than about 20% above the maximum concentration obtained using continuous infusion. To avoid adverse reactions in the patient, particularly side effects involving bleeding, the dose rate should be less than a dose rate that is equivalent to continuous intravenous infusion of ala-TFPI at about 0.050 mg/kg/hr.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

- [63] All doses described herein, including dose rates and total doses, are subject to up to 10% variation in practice due to errors in determining protein concentration and biological activity with the prothrombin assay. Thus, any actually administered dose up to 10% higher or 10% lower than a dose stated herein is considered to be equivalent to the stated dose. For this reason, all doses have been stated as "about" a specific dose. For example, a dose described as "about 0.025 mg/kg/hr" is considered equivalent to any actual dose ranging from 0.0225 to 0.0275 mg/kg/hr.
- [64] A bolus injection or a briefly higher infusion rate of TFPI or an analog of TFPI may also be employed in the practice of the present invention if followed by low dose TFPI administration. For example, a bolus injection or higher infusion rate can be used to reduce the equilibration time of administered TFPI or TFPI analog in the circulation of a patient. In doing so, the eventual steady state plasma level of TFPI can be reached more rapidly and receptors for TFPI can be saturated faster. Administration of ala-TFPI to humans at about 0.025 mg/kg/hr for 2 hours increases plasma levels of TFPI (plus ala-TFPI) from about 80 ng/ml to about 125 ng/ml, or an increase of approximately 50%. The same level will be reached faster if the infusion rate is increased, or a bolus injection is used. Higher infusion rates will result in higher levels if infusion is continued until steady state is obtained. Steady state level for administration of ala-TFPI at about 0.050 mg/kg/hr was found to be about 300 ng/ml, and for administration of ala-TFPI at about 0.33 or about 0.66 mg/kg/hr was found to be about at least 2 µg/ml in patients suffering from sepsis.
- [65] Total daily dose administered to a host in a single continuous infusion or in divided infusion doses may be in amounts, for example, equivalent to administration of at least about 0.006 mg/kg/day to less than about 1.2 mg/kg/day of ala-TFPI, more usually equivalent to administration of from about 0.24 mg/kg/day to less than about 1.2 mg/kg/day of ala-TFPI, and preferably equivalent to about 0.6 mg/kg/day of ala-TFPI. Lower amounts within this range may be useful for prophylactic or other purposes. The dosing protocols of the invention can also be expressed as the total dose administered to the patient. The total dose is the mathematical product of the rate of infusion and the

WO 03/032904

PCT/US02/32624

total time of infusion. For example, at the preferred dose rate of about 0.025 mg/kg/hr for ala-TFPI and the preferred infusion time of 96 hours, the total dose is about 2.4 mg ala-TFPI per kg body weight. The total dose of TFPI administered according to the invention is equivalent to at least about 0.75 µg/kg and less than about 4.8 mg/kg of ala-TFPI. Preferably the total dose is equivalent to at least about 1 mg/kg and less than about 4.8 mg/kg of ala-TFPI. More preferably the total dose is equivalent to about 2.4 mg/kg of ala-TFPI.

- [66] One factor that can be used to adjust the dosage regimen is the individual patient's coagulation function, which is typically measured using a prothrombin time (PT) assay, or the International Normalized Ratio (INR). INR is the standardization of the PT assay in which the assay is calibrated against an international reference thromboplastin reagent. See, e.g., R.S. Riley *et al.*, J. Clin. Lab. Anal. 14:101-114 (2000). The INR response to ala-TFPI in healthy human volunteers is approximately linear over the range of plasma concentrations seen (Fig. 3). The overall change in INR is 1.2 units per 1 µg/ml increase of plasma ala-TFPI concentration.
- [67] In a pharmacodynamic model, the INR response to ala-TFPI is best described by a log-linear model in which log INR was linearly related to ala-TFPI plasma concentration. The log-linear nature of the response means that subjects with elevated INR at baseline are likely to experience greater anticoagulant responses than subjects with low baseline values who have similar levels of circulating ala-TFPI.
- [68] The dosing regimens described above, including dosing rate on a mg/kg/hr basis and total daily dose, are expressed as a dose "equivalent to administration of reference ala-TFPI." This means that they are determined quantitatively by normalization to a dose of "reference ala-TFPI" which is defined as mature, 100% pure (on a protein basis), properly folded, biologically active, non-glycosylated ala-TFPI. Ala-TFPI is an analog of TFPI whose amino acid sequence is depicted in SEQ ID NO:2. Other forms of TFPI can also be used in the invention, including mature, full-length TFPI and analogs thereof. To determine the appropriate dosing range for practicing the invention with forms of TFPI

WO 03/032904

PCT/US02/32624

other than ala-TFPI and with preparations of ala-TFPI or another TFPI analog that are less than 100% pure, the dosing ranges described herein for reference ala-TFPI can be adjusted based on the intrinsic biological activity of the particular form of TFPI and further adjusted based on the biochemical purity of the preparation.

- [69] The intrinsic biological activity of TFPI or a TFPI analog refers to the specific activity, as defined by the prothrombin assay, of the mature, 100% pure, properly folded TFPI or TFPI analog. Thus, the equivalent dose is calculated as (reference ala-TFPI dose) / ((relative intrinsic activity) x (biochemical purity)), where relative intrinsic activity refers to (intrinsic activity of analog) / (intrinsic activity of reference ala-TFPI). For example, if a particular TFPI analog has an intrinsic biological activity which is 80% that of reference ala-TFPI, then the equivalent dose for the particular TFPI analog are obtained by dividing the dose values for reference ala-TFPI by 0.8. Further, if the formulation administered to a patient is, for example, only 90% biochemically pure, *i.e.*, comprising 10% of molecular species which lack biological activity of TFPI, then an additional correction of the reference dose values for ala-TFPI is performed by dividing the dose values by 0.9. Thus, for a hypothetical TFPI analog that has 80% of the intrinsic activity of ala-TFPI and is 90% biochemically pure as administered, a dose rate equivalent to administration of reference ala-TFPI at 0.025 mg/kg/hr would be 0.0347 mg/kg/hr (*i.e.*, $0.025 / (0.8 \times 0.9)$).

- [70] Equivalent doses can also be determined without knowing either intrinsic activity or biochemical purity by determining relative biological activity. Relative biological activity can be determined by comparing a particular TFPI analog to a TFPI biological activity standard using the prothrombin time assay. For example, ala-TFPI produced according to the method of Example 9 of WO 96/40784, which contains about 85% biologically active TFPI molecular species, can be used as a TFPI biological activity standard. Ala-TFPI produced according to the method of Example 9 of WO 96/40784 has about 85% of the activity of reference ala-TFPI in the prothrombin assay. In plotting a prothrombin time standard curve, the log of clotting time is plotted against the log of TFPI concentration. If the TFPI biological activity standard possesses 85% of the

WO 03/032904

PCT/US02/32624

activity of reference ala-TFPI, then a standard curve can be prepared which is equivalent to that for reference ala-TFPI if the concentrations of the TFPI biological activity standard are multiplied by 0.85 prior to plotting, so that the activity plotted is equivalent to the activity of 100% pure reference ala-TFPI. When the clotting time for a particular TFPI analog is compared to the standard curve, the equivalent concentration of reference ala-TFPI can be read off the curve. Alternatively, if the slope of the linear portion of the standard curve is obtained by linear regression analysis, then the slope can be corrected based on the activity of the TFPI biological activity standard relative to reference ala-TFPI. The relative biological activity of a particular TFPI analog is thus equal to the ratio of reference ala-TFPI activity to the activity of the analog. For example, if a particular analog requires 1.43 μg to produce the same prothrombin time activity as 1.00 μg of reference ala-TFPI, then the relative biological activity of the analog is $1.00/1.43$, or 0.7. For that analog, the equivalent dose to a reference ala-TFPI dose is obtained by dividing the reference ala-TFPI dose by the relative biological activity of the analog. For example, a 0.025 mg/kg/hr dose for reference ala-TFPI would be equivalent to 0.0357 mg/kg/hr of the analog (*i.e.*, $0.025/0.7$).

- [71] While TFPI or a TFPI analog can be administered as the sole active anticoagulation pharmaceutical agent, these molecules also can be used in combination with one or more additional therapeutic agents to provide a combination therapy for the treatment of severe pneumonia. Such additional therapeutic agents include antibodies such as, for example, anti-endotoxin, monoclonal antibodies (*e.g.*, endotoxin-binding Mabs) and anti-TNF products such as an anti-TNF murine Mab. TFPI and TFPI analogs can also be combined with interleukin-1 receptor antagonists, bactericidal/permeability increasing (BPI) protein, immunostimulant, compounds having anti-inflammatory activity such as PAF antagonists, and cell adhesion blockers (*e.g.*, antiplatelet agents such as GPIIb/IIIa inhibitors). When administered as a combination, the therapeutic agents can be formulated as separate compositions that are given at the same time or different times. Preferably, additional therapeutic agents are given either at the same time (*i.e.*, during the administration period of TFPI or TFPI analogs) or within 24 hours of the administration period of TFPI or TFPI analogs (*i.e.*, within 24 hours prior to the start of, or within 24

WO 03/032904

PCT/US02/32624

hours after the end of, the administration period of TFPI or TFPI analogs). Additional therapeutic agents can also be given as a single composition together with the TFPI or TFPI analogs.

- [72] TFPI or a TFPI analog also can be given in combination with other agents that would be effective to treat severe pneumonia. For example, the following may be administered in combination with TFPI or a TFPI analog: antibiotics that can treat the underlying bacterial infection, monoclonal antibodies that are directed against bacterial cell wall components, receptors that can complex with cytokines that are involved in the severe pneumonia pathway, , and generally any agent or protein that can interact with cytokines or other activated or amplified physiological pathways including complement proteins to attenuate severe pneumonia and/or its symptoms.
- [73] Useful antibiotics include those in the general category of: beta-lactam rings (penicillin), amino sugars in glycosidic linkage (aminoglycosides), macrocyclic lactone rings (macrolides), polycyclic derivatives of naphthacene-carboxamide (tetracyclines), nitrobenzene derivatives of dichloroacetic acid, peptides (bacitracin, gramicidin, and polymyxin), large rings with a conjugated double bond system (polyenes), sulfa drugs derived from sulfanilamide (sulfonamides), 5-nitro-2-furanyl groups (nitrofurans), quinolone carboxylic acids (nalidixic acid), and many others. Other antibiotics and more versions of the above specific antibiotics may be found in Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Edition, Kirk-Othmer (ed.), Vol. 2, pages 782-1036 (1978) and Vol. 3, pages 1-78, Zinsser, MicroBiology, 17th Edition W. Joldik *et al.* (Eds.) pages 235-277 (1980), or Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 27th Edition, W. B. Saunders Company (1988).
- [74] Other agents that may be combined with TFPI or a TFPI analog include endotoxin antagonists such as E5531 (a Lipid A analog, *see* Asai *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 22:432 (1999)), TF analogs with anticoagulant activity (*see, e.g.*, Kelley *et al.*, Blood 89:3219 (1997) and Lee & Kelley, J. Biol. Chem. 273:4149 (1998)), monoclonal antibodies directed to cytokines, such as those monoclonal antibodies directed to IL-6 or M-CSF,

WO 03/032904

PCT/US02/32624

see U.S. Ser. No. 07/451,218, filed Dec. 15, 1989, and monoclonal antibodies directed to TNF (see Cerami *et al.*, U.S. Pat. No. 4,603,106), inhibitors of protein that cleave the mature TNF prohormone from the cell in which it was produced (see U.S. Ser. No. 07/395,253, filed Aug. 16, 1989), antagonists of IL-1 (see U.S. Ser. No. 07/517,276, filed May 1, 1990), inhibitors of IL-6 cytokine expression such as inhibin (see U.S. Patent 5,942,220), and receptor based inhibitors of various cytokines such as IL-1. Antibodies to complement or protein inhibitors of complement, such as CR1, DAF, and MCP also can be used.

- [75] All patents, patent applications, and references cited in this disclosure are incorporated herein by reference in their entireties.
- [76] The present invention will now be illustrated by reference to the following examples that set forth particularly advantageous embodiments. However, it should be noted that these embodiments are illustrative and are not to be construed as restricting the invention in any way.

EXAMPLES

Example 1. ala-TFPI treatment of severe pneumonia patients

- [77] Patients with severe pneumonia were evaluated to explore the potential affect of treatment with ala-TFPI in a relatively homogeneous group. Pneumonia patients were identified if one source of sepsis documented by the investigator was coded as pneumonia. Other sites of infection could also be present. Due to the difficulty in differentiating infectious from chemical sequelae, patients with aspiration pneumonia were not included. Patients identified as having pneumonia were then classified as being culture positive (any evidence of infection such as culture or Gram stain), or culture negative (negative culture or culture not done). Patients were treated by continuous intravenous infusion with a preparation of non-glycosylated ala-TFPI expressed in *E. coli* at a dose of 0.025 mg/kg/h formulated in a buffer containing 300 mM L-arginine, 20 mM sodium citrate, pH 5.5, osmolality 560 +/- 110mOsm. Placebo consisted of the same

WO 03/032904

PCT/US02/32624

buffer without ala-TFPI and was infused at the same rate as the study drug. Results of these analyses demonstrate a positive effect from ala-TFPI treatment in those patients with culture positive pneumonia (Table 1). Those patients without evidence of an infectious source demonstrated a negative effect.

Table 1. Mortality by Pneumonia Status

<i>INR</i> ≥ 1.2	<i>Overall</i>		
	Placebo	TFPI	p=
Pneumonia Culture Positive			
(N=)	236	268	
% Mortality	39.8%	31.3%	0.05
Pneumonia Culture Negative			
(N=)	118	122	
% Mortality	30.5%	45.1%	0.02

Table 2. Mortality by Pneumonia Status Low INR

<i>INR</i> < 1.2	<i>Overall</i>		
	Placebo	TFPI	p=
Pneumonia Culture Pos.			
(N=)	33	22	
% Mortality	30.3%	13.6%	0.15
Pneumonia Culture Neg.			
(N=)	25	23	
% Mortality	32.0%	8.7%	0.08

WO 03/032904

PCT/US02/32624

[78] The increased mortality in the high INR culture negative group appeared to be present in patient populations with or without added administration of heparin, although it should be noted that the number of subjects in the pneumonia culture negative, non-heparin group is relatively small (Table 3). A strong positive treatment effect was observed in the culture positive / no heparin cohort.

Table 3. Mortality by Pneumonia Status and Heparin

INR ≥ 1.2	Pneumonia Culture Positive			Pneumonia Culture Negative		
	Placebo	TFPI	p ^{ns}	Placebo	TFPI	p ^{ns}
Heparin at Baseline or During Dosing						
(N=)	160	187		87	85	
% Mortality	32.5%	31.6%	0.84	36.8%	56.5%	0.01
No Heparin at Baseline or During Dosing						
(N=)	76	81		31	37	
% Mortality	55.3%	30.9%	0.002	32.3%	48.6%	0.17

Example 2. Investigation of baseline severity of illness variables

[79] A number of baseline severity of illness variables were evaluated to determine whether there were group imbalances that could explain the observed outcome. These data indicate that the difference in outcomes associated with culture status are not due to baseline imbalances. Accordingly, the results appear to represent a differential effect of TFPI treatment due to biological differences between patients with and without infection. Despite the fact that the severity indicators (*e.g.*, APACHE II score or organ dysfunction score) were either equal to placebo or lower in the TFPI treated pneumonia culture negative group the culture negative group demonstrated the highest overall mortality (Table 4).

WO 03/032904

PCT/US02/32624

Table 4. Baseline Severity of Illness by Pneumonia Status

INR ≥ 1.2	Pneumonia Culture Positive		Pneumonia Culture Negative	
	Placebo	TFPI	Placebo	TFPI
N=	236	268	118	122
% Mortality	39.8%	31.3%	30.5%	45.1%
APACHE II	25.8	25.9	24.3	25.2
INR	1.53	1.50	1.52	1.45
Mean Organ Dysfunctions	3.0	3.0	3.0	2.9
CV - Hypotension	79%	74%	73%	72%
Acidosis	66%	66%	64%	58%
Oliguria	42%	48%	47%	49%
Pulmonary Dysfunction	93%	91%	91%	90%
Thrombocytopenia	20%	23%	22%	16%

[80] IL-6 is an inflammatory cytokine that is elevated early in sepsis, reflects the intensity of the inflammatory response and is associated with outcome. At baseline, IL-6 levels are lower in patients clinically identified as having pneumonia but without evidence of infection (Table 5). This suggests that there is a biological difference between patients with a documented infectious source of pneumonia versus those without an apparent infectious source. Paradoxically, the culture negative TFPI group has the lowest baseline IL-6 levels but the highest mortality rate. In a sepsis population IL-6 levels fall over time. The rate of fall in IL-6 is reduced in TFPI treated pneumonia culture negative subjects (Table 5). This suggests that the biological effect of TFPI may differ in those patients with and without infection.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

Table 5. IL-6 by Pneumonia Status

INR \geq 1.2 Pneumonia	Baseline			6 hrs (% Δ^*)			24 hrs (% Δ^*)			96 hrs (% Δ^*)		
	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=
Culture Positive (n=493)	495	489	0.96	-25%	-27%	0.75	-57%	-63%	0.26	-83%	-84%	0.69
Culture Negative (n=236)	300	195	0.11	-21%	-8%	0.08	-54%	-32%	0.03	-98%	-97%	0.06

* % Δ = % change from baseline (geometric mean)**Example 3. Analysis of severe pneumonia patients by type of documentation of infection**

[81] As discussed above, an overall benefit from ala-TFPI treatment was observed in those patients with the highest certainty of infection, *i.e.*, those with a positive blood culture. In an analysis of severe pneumonia patients by type of documentation of infection, a benefit from ala-TFPI treatment was seen in both subjects with a positive blood culture and those with other evidence (Table 6). The effect was strongest in the bacteremia group, *i.e.*, the group with the highest probability of infection or most demonstrable source of infection.

Table 6. Mortality by Culture Status and Pneumonia Status

INR \geq 1.2	Blood Culture Positive			Other Culture Positive			Culture Negative / ND		
	Placebo	TFPI	p=	Placebo	TFPI	p=	Placebo	TFPI	p=
Pneumonia									
(N=)	80	107		156	161		110	110	
% Mortality	38.8%	26.2%	0.07	40.4%	34.8%	0.30	30.9%	46.4%	0.02

WO 03/032904

PCT/US02/32624

- [82] As previously shown, patients with documentation of infection (blood + "other") benefited from TFPI treatment in the absence of heparin. This result is mostly due to the benefit derived from the pneumonia group (Table 7). This finding seems to indicate that the benefit from endogenous anticoagulants is greatest in those patients with severe pulmonary infections.

Table 7. Mortality by Infection Status, Pneumonia Status and Heparin Use

INR ≥ 1.2	Heparin			No Heparin		
	Placebo	TFPI	p ^{ns}	Placebo	TFPI	p ^{ns}
Documented Infection (Blood + "Other")						
N=	433	442		211	207	
% Mortality	31.4%	31.9%	0.89	43.1%	32.4%	0.02
Pneumonia (Culture Positive)						
N=	160	187		76	81	
% Mortality	32.5%	31.6%	0.84	55.3%	30.9%	0.002
Non-Pneumonia Documented Infections (Documented minus Pneumonia)						
N=	273	255		135	126	
% Mortality	30.8%	32.2%	0.73	36.3%	35.3%	0.62

- [83] To further limit heterogeneity, future trials can be focused on community acquired pneumonia (CAP). Patients who develop pneumonia while in hospital (nosocomial pneumonia) are more likely to be colonized with pathogenic organisms and have other pulmonary disorders making the diagnosis of infectious pneumonia more difficult. In addition, patients with CAP are less likely to have been exposed to heparin than patients with nosocomial pneumonia. When data were analyzed by length of stay in hospital prior treatment, a similar benefit was noted for culture positive patients hospitalized ≤ 2 days

WO 03/032904

PCT/US02/32624

(community acquired) versus those hospitalized longer than 2 days (nosocomial). The negative effect in the culture negative patients was seen primarily in the nosocomial group (Table 8).

Table 8. Mortality by Pneumonia Status and Time from Hospitalization

INR ≥ 1.2	Pneumonia Culture Positive			Pneumonia Culture Negative		
	Placebo	TFPI	p=	Placebo	TFPI	p=
Community Acquired (≤ 2 days)						
(N=)	121	143		61	52	
% Mortality	38.8%	29.4%	0.10	27.9%	30.8%	0.74
Nosocomial (> 2 days)						
(N=)	115	125		57	70	
% Mortality	40.9%	33.6%	0.24	33.3%	55.7%	0.01

[84] The present invention has been described with reference to specific embodiments. However, this application is intended to cover those changes and substitutions which may be made by those skilled in the art without departing from the spirit and the scope of the appended claims.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of treating or preventing severe pneumonia comprising:

administering TFPI or a TFPI analog to a patient who has or who is at risk of having severe pneumonia.
2. The method of claim 1 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
3. The method of claim 1 wherein said patient has a demonstrable infection.
4. The method of claim 1 wherein said TFPI or TFPI analog is administered by continuous intravenous infusion at a dose rate equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate of less than about 0.66 mg/kg/hr.
5. The method of claim 4 wherein said dose rate is equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate from about 0.00025 to about 0.050 mg/kg/hr and wherein said TFPI or TFPI analog is administered for at least about 72 hours.
6. The method of claim 5 wherein said dose rate is equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate from about 0.010 to about 0.045 mg/kg/hr.
7. The method of claim 6 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
8. The method of claim 6 wherein said dose rate is equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate of about 0.025 mg/kg/hr.
9. The method of claim 8 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
10. The method of claim 1 wherein said TFPI or said TFPI analog is administered for at least about 96 hours.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

11. The method of claim 10 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
12. The method of claim 10 wherein said TFPI or TFPI analog is administered by continuous intravenous infusion to provide a total dose equivalent to administration of reference ala-TFPI at a total dose from about 0.024 to about 4.8 mg/kg.
13. The method of claim 12 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
14. The method of claim 10 wherein said TFPI or TFPI analog is administered by continuous intravenous infusion at a dose rate equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate of about 0.025 mg/kg/hr.
15. The method of claim 14 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
16. The method of claim 1 wherein said TFPI or TFPI analog is administered by continuous intravenous infusion to provide a daily dose equivalent to administration of reference ala-TFPI at a daily dose from about 0.006 mg/kg to about 1.2 mg/kg.
17. The method of claim 16 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
18. The method of claim 1 wherein said TFPI analog comprises a first Kunitz domain consisting of amino acids 19-89 of SEQ ID NO:1.
19. The method of claim 18 wherein said TFPI analog further comprises a second Kunitz domain consisting of amino acids 90-160 of SEQ ID NO:1.
20. The method of claim 1 wherein said TFPI analog comprises amino acids 1-160 of SEQ ID NO:1.
21. The method of claim 1 wherein said TFPI analog comprises a second Kunitz domain consisting of amino acids 90-160 of SEQ ID NO:1.
22. The method of claim 21 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

23. The method of claim 1 wherein said TFPI or TFPI analog is prepared from a lyophilized composition comprising TFPI or a TFPI analog.
24. The method of claim 23 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
25. The method of claim 1 wherein said TFPI or TFPI analog is administered as a formulation comprising arginine.
26. The method of claim 25 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
27. The method of claim 1 wherein said TFPI or TFPI analog is administered as a formulation comprising citrate.
28. The method of claim 27 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
29. The method of claim 1 wherein said TFPI or TFPI analog has a concentration of about 0.15 mg/ml in a formulation comprising about 300 mM arginine hydrochloride and about 20 mM sodium citrate and having a pH of about 5.5.
30. The method of claim 29 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
31. The method of claim 1 further comprising administering, at the same time as, or within 24 hours of administering said TFPI or TFPI analog, an additional agent selected from the group consisting of an antibiotic, an antibody, an endotoxin antagonist, a tissue factor analog having anticoagulant activity, an immunostimulant, a cell adhesion blocker, heparin, BPI protein, an IL-1 antagonist, pafase (PAF enzyme inhibitor), a TNF inhibitor, an IL-6 inhibitor, and an inhibitor of complement.
32. The method of claim 31 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
33. The method of claim 31 wherein said additional agent is an antibody, wherein said antibody binds specifically to an antigen selected from the group consisting of TNF, IL-6, and M-CSF.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

34. The method of claim 33 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
35. A method for treating severe pneumonia, comprising:
- administering to a patient (i) TFPI or a TFPI analog and (ii) an additional agent selected from the group consisting of an antibiotic, a monoclonal antibody, a cytokine inhibitor, and a complement inhibitor.
36. The method of claim 35 wherein said TFPI analog is non-glycosylated ala-TFPI.
37. The method of claim 35 wherein said patient has a demonstrable infection.
38. The method of claim 35 wherein said TFPI or TFPI analog is administered by continuous intravenous infusion at a dose rate equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate of less than about 0.66 mg/kg/hr.
39. The method of claim 38 wherein said dose rate is equivalent to administration of reference ala-TFPI at a dose rate from about 0.00025 to about 0.050 mg/kg/hr.

WO 03/032904

PCT/US02/32624

SEQUENCE LISTING

<110> Chiron Corporation

<120> Treatment of Severe Pneumonia by
Administration of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

<130> 012441.00029

<150> US 60/328,806

<151> 2001-10-15

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<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 Tyr 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 Tyr Ile Thr Arg
100    105    110
Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr 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    180
Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
185    190    195
Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
200    205    210
Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
215    220    225
Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
230    235    240
Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
245    250    255

```

WO 03/032904

PCT/US02/32624

```

Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr 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 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 Glu Lys Pro Asp
85      90      95
Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr
100     105     110
Arg Tyr 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

```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/032904 A3

(51) International Patent Classification: **A61K 38/16**

(21) International Application Number:
PCT/US2002/032624

(22) International Filing Date: 15 October 2002 (15.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/328,806 15 October 2001 (15.10.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **CHIRON CORPORATION** [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2917 (US).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): **CREASEY, Abba, A.** [US/US]; 8 Langdon Court, Piedmont, CA 94611 (US).

(74) Agent: **GUTH, Joseph, H.**; Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2917 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
4 March 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 2003/032904 A3

(54) Title: TREATMENT OF SEVERE PNEUMONIA BY ADMINISTRATION OF TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR (TFPI)

(57) Abstract: Methods for prophylactically or therapeutically treating severe pneumonia involve administration of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) or a TFPI analog to patients suffering from or at risk of developing this condition. The methods involve the use of continuous intravenous infusion of TFPI or a TFPI analog, preferably at low doses to avoid adverse side effects.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/32624
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/16 US CL : 514/12; 530/350, 300 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/12; 530/350, 300 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,212,091 A (DIAZ-COLLIER et al.) 18 May 1993 (18.05.1993), column 3, lines 48-63.	1-39
Y	US 5,563,123 A (INNIS et al.) 08 October 1996 (08.10.1996), column 17, lines 22-58.	25-30
Y	FELDMAN et al. Anti-TNF alpha therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: Analysis of the mechanism of action predicts utility in other diseases. Transplantation Proc. December 1998, Vol. 30, No. 8, pages 4126-4127, especially paragraph bridging pages 4126-4127.	31-35
Y	GUNTHER et al. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia. Comparison with the acute respiratory distress syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. February 2000, Vol. 161, No. 2, Pt. 1, pages 454-462, especially Abstract.	1-39
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 23 September 2003 (23.09.2003)	Date of mailing of the international search report 24 DEC 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Salvador D. Roberts for</i> David S. Romeo Telephone No. 703 308-0196	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 47/18	A 6 1 K 37/465	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA29 BB13 CC32 DD43Z DD51Z GG06
 4C084 AA02 DC32 DC50 MA16 MA44 MA66 NA10 ZB351
 4C085 AA14 BB17
 4C086 AA01 AA02 EA27 MA02 MA04 NA10 ZB35