



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02824900.3

[43] 公开日 2005 年 4 月 6 日

[11] 公开号 CN 1604790A

[22] 申请日 2002. 10. 15 [21] 申请号 02824900. 3

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 15 [33] US [31] 60/328,806

[86] 国际申请 PCT/US2002/032624 2002. 10. 15

[87] 国际公布 WO2003/032904 英 2003. 4. 24

[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 14

[71] 申请人 希龙公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 A · A · 克里西

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 22 页 序列表 3 页

[54] 发明名称 通过施用组织因子途径抑制剂
(TFPI) 治疗严重性肺炎

[57] 摘要

预防或治疗严重性肺炎的方法，包括施用组织因子途径抑制剂(TFPI)或TFPI类似物给患此病或有可能患病的患者。所说方法包括使用连续静脉内输注低剂量TFPI或TFPI类似物以避免不利的副作用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种治疗或预防严重性肺炎的方法，所述方法包括：
施用 TFPI 或 TFPI 类似物给患此病或有可能患病的患者。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述患者被证实感染。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物是以一定的剂量率通过连续静脉内输注给予的，所述剂量率相当于以小于约 0.66mg/kg/hr
10 的剂量率施用参考 ala-TFPI。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述剂量率相当于以约 0.00025 到约 0.050mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物施用至少约 72 小时。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述剂量率相当于以约 0.010 到约
15 0.045mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。
8. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述剂量率相当于以约 0.025 mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI。
- 20 9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。
10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物施用至少约 96 小时。
11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化
25 ala-TFPI。
12. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，通过连续静脉注射施用所述 TFPI 或 TFPI 类似物，提供相当于以约 0.024 到约 4.8mg/kg 的总剂量施用参考 ala-TFPI 的总剂量。
13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化
30 ala-TFPI。
14. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，通过连续静脉注射施用所述 TFPI

或 TFPI 类似物，施用的剂量率相当于以约 0.025mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。

5 16. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，通过连续静脉注射施用所述 TFPI 或 TFPI 类似物，提供相当于以约 0.006mg/kg 到约 1.2mg/kg 的日剂量施用参考 ala-TFPI 的日剂量。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。

10 18. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物包括由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 19-89 组成的第一个 Kunitz 结构域。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物还包括由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 90-160 组成的第二个 Kunitz 结构域。

15 20. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-160。

21. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物还包括由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 90-160 组成的第二个 Kunitz 结构域。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。

20 23. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物由冻干组合物制备，所述组合物包含 TFPI 或 TFPI 类似物。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。

25 25. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物作为含精氨酸的制剂施用。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。

27. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物作为含柠檬酸的制剂施用。

30 28. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化 ala-TFPI。

29. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物在制剂中的浓度约为 0.15 mg/ml，所述制剂包含约 300mM 盐酸精氨酸和约 20mM 柠檬酸钠，其 pH 约 5.5。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化
5 ala-TFPI。

31. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括在所述施用期或
24 小时内施用另外的试剂，所述试剂选自抗生素、抗体、内毒素拮抗剂、具抗凝
血活性的组织因子类似物、免疫刺激剂、细胞粘附阻断剂、肝素、BPI 蛋白、IL-1
拮抗剂、pafase (PAF 酶抑制剂)、TNF 抑制剂、IL-6 抑制剂和补体抑制剂。

10 32. 如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化
ala-TFPI。

33. 如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述另外的试剂是抗体，所述与
抗原特异结合的抗体选自 TNF、IL-6 和 M-CSF。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化
15 ala-TFPI。

35. 一种治疗严重性肺炎的方法，所述方法包括：

施用给患者 (i) TFPI 或 TFPI 类似物和 (ii) 另外试剂，所述试剂选自抗生素、单
克隆抗体、细胞因子抑制剂和补体抑制剂。

36. 如权利要求 35 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 类似物是非糖基化
20 ala-TFPI。

37. 如权利要求 35 所述的方法，其特征在于，所述患者被证实感染。

38. 如权利要求 35 所述的方法，其特征在于，所述 TFPI 或 TFPI 类似物是以一
定的剂量率通过连续静脉内输注给予的，所述剂量率相当于以小于约
0.66mg/kg/hr 的剂量率施用参考 ala-TFPI。

25 39. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述剂量率相当于以约 0.00025
到约 0.050mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI。

通过施用组织因子途径抑制剂(TFPI)治疗严重性肺炎

5 相关专利申请的参照

本专利申请要求提交于 2001 年 10 月 15 日的临时专利申请序列号 60/328,806 的优先权, 本文全部纳入供参考。

发明的领域

10 本发明涉及治疗性处理严重性肺炎的方法。更具体地, 它涉及施用组织因子途径抑制剂蛋白质以减弱与严重性肺炎相关的高度增生或扩增生理途径。

发明的背景

肺炎是由于一种或多种肺功能元件的急性感染引起的, 这些元件包括肺泡腔和
15 间质组织。在美国, 每年约有 200 万人患上肺炎, 其中有 40,000-70,000 人死亡。肺炎是第六大致死疾病, 且是最常见的致命的医院源性(医院获得的)感染。在美国, 社会获得性肺炎(CAP)对卫生保健耗费有显著影响, 估计每年的直接花费为 140 亿美元, 损失高达 90 亿美元。(Lynch JP, Martinez FJ. *Community-acquired pneumonia*. Curr Opin Pulm Med. 1998; 4:162-172)。在发展中国家, 下呼吸道感染通常是造成死亡的主要原因, 或仅次于感染性腹泻。(The Merck Manual, 第 6
20 部分, Ch. 73, Pneumonia, 2000)。

根据不同组织, 包括美国胸协(American Thoracic Society)(ATS), 制订的方针确定了“严重性肺炎”症状的特征。(Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1730-1754)。例如, 在诊断严重性肺炎时, 除其它标准外, ATS 要求至少一个
25 主要标准, 如机械换气或脓毒病性休克。通常, 严重性肺炎可能是由于急性肺病、肺部炎性疾病、或因炎症或血液凝固等因素引起的肺功能的任何紊乱造成的。严重性 CAP 的诊断基于肺炎 ICU 的住院患者。流行病学上, 这类患者群体约占所有 ICU 入院患者的 10%。肺炎 ICU 中的患者在所有 CAP 患者中死亡率最高(30%-40%), 而一般的 CAP 住院患者仅为 15%。

30 在美国, 每年约有 400 万成人被诊断患社会获得性肺炎(CAP), 其中有 600,000

需要住院治疗。Fine 等, N. Engl. J. Med. 336, 243-50, 1997。总体来说, CAP 的发病率随年龄增加, 在 65 岁及以上人群在最流行。Marston 等, Arch Intern Med. 1997: 1709-1718。这一发病率在患有慢性阻塞性肺炎、气喘、糖尿病、酒精中毒、免疫抑制、肾机能不全、慢性肝病和心脏病等并发症(comorbidities)的患者中更高。Marrie, Curr Opin Pulm Med.1996; 2: 192-197; Niedermann et AL., Am Rev RESPIRDIS 1993 ; 148: 1418-1426。

在美国, 肺炎是感染致死的首要原因, 总体而言是第六大致死因素。与肺炎有关的死亡率从 1979 年到 1992 年增加了 22%, 在 1992 年, 89% 的年龄较大的患者(65 岁及以上)的死亡与肺炎有关。参见“美国肺炎和流感死亡率, 1979-1994[在 MMWR. 上刊有更正, 1995; 44: 782]。MMWR. 1995; 44: 535-537。Fine 和他的同事(1997)报道说, 一些共存的疾病(肿瘤性疾病、充血性心力衰竭(CHF)、脑血管病、肾病和肝病)和一些身体检查结果(精神状态改变、心律增加、呼吸率增加、收缩压降低和体温异常降低或升高)都与升高的与 CAP 有关的发病率有关。此外, 在美国, CAP 对保健花费有重大影响, 估计每年的直接花费为 140 亿, 而损失高达 90 亿。

Lynch 和 Martinez, Curr Opin Pulm Med. 1998; 4: 162-172。

组织因子途径抑制剂(TFPI)是哺乳动物血浆中存在的蛋白质和丝氨酸蛋白酶抑制剂。Thomas, Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 26(1947); Schnaider, Am. J. Physiol. 149, 123(1947); Broze & Miletich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1886(1987)。TFPI 也称为组织因子抑制剂、组织促凝血酶原激酶抑制剂、因子 III 抑制剂、外源性途径抑制剂(EPI)、脂蛋白相关凝血抑制剂(LACI)。名称“组织因子途径抑制剂(TFPI)”在 1991 年 6 月 30 日被血栓症和止血国际学会接受。

血凝活化是血流转变成固体凝胶或凝块。此外, 凝血蛋白酶的消耗导致过度出血。主要事件是可溶性纤维蛋白原转变成不溶性纤维蛋白链, 尽管纤维蛋白本身仅形成 0.15% 的总血凝块。此转变是复杂酶级联的最后一步。组分(因子)作为酶原存在, 酶原是蛋白水解酶的失活前体, 通过在特异性位点蛋白酶裂解而转变成活性酶。少量的一种因子的活化催化较大量的下一因子的形成并以此类推, 产生的拉增使纤维蛋白非常迅速地形成。

认为凝血通过管损伤起始, 管损伤使因子 VIIa 接触内皮下面细胞上表达的组织因子(TF)。因子 VIIa-TF 复合体分解因子 X 到因子 Xa, 且分解因子 IX 到因子 IXa。TFPI 结合因子 VIIa 和因子 Xa。TFPI、因子 VIIa(结合 TF)和用于 Xa 间形成的复合体进一步抑制维持止血所需的因子 Xa 和 Ixa 的形成。Broze, Jr.,

Ann. Rev. Med. 46:103(1995)。

通过直接导入血流的细菌内毒素活化凝血级联可在动脉表面上产生广泛纤维蛋白沉积,以及耗尽纤维蛋白原、前凝血素、因子V和VIII和血小板。此外,刺激纤维蛋白溶解系统进一步导致纤维蛋白降解产物的形成。

- 5 在凝血活化明显由细菌产物(如内毒素)起始同时,违反机制也似乎被凝血活化,即活化纤维蛋白溶解系统。活化的因子XIII将纤溶酶原前激活剂转变成纤溶酶原激活剂,纤溶酶原激活剂随后将纤溶酶原转变成纤溶酶,从而介导血块裂解。因此活化血浆纤维蛋白溶解系统也提供出血倾向。

- 10 内毒素血症与组织纤溶酶原激活剂抑制剂(PAI)的循环水平增加相关。此抑制剂迅速使组织纤溶酶原激活剂(TPA)失活,从而阻碍它通过将纤溶酶原活化成纤溶酶促进纤维蛋白溶解的能力。纤维蛋白溶解受损可引起纤维蛋白沉积在血管中,因而产生脓毒性休克相关的DIC。

- 正在努力鉴定令人满意的介入,以防止或治疗严重性肺炎和相关凝血病。阻止凝血途径的试剂不一定有效治疗或预防治疗严重性肺炎。例如,肝素是普遍使用的抗凝血剂。然而,控制肝素的使用较困难,因为肝素可诱导过度出血或减少凝血,而没有存活没有任何益处。参见Aoki等,《在治疗弥散性血管内凝血中活化蛋白质C和未分级肝素的双盲随机试验比较》(A Comparative Double-BLIND randomized Trial of Activated Protein C and Unfractionated Heparin in the Treatment of Disseminated Intravascular Coagulation) *Int. J. Hematol.* 75, 15 540-47(2002)。一些临床试验不能证明肝素治疗降低脓毒病死亡率,这主要在以暴发性DIC为显著特征的脑膜炎球菌内毒素血症中。参见例如Corrigan等,《肝素治疗具弥散性血管内凝血的脓毒病,对死亡率和纠正止血缺陷的效果》(Heparin Therapy in Septacemia with Disseminated Intravascular Coagulation. Effect on Mortality and on Correction of Hemostatic Defects), *N. Engl. J. Med.*, 20 283:778-782(1970); Lasch等,《肝素治疗弥散性血管内凝血(DIC)》(Heparin Therapy of Diffuse Intravascular Coagulation) *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 33:105(1974); Straub,《抗肝素治疗血管内凝血的病例》(A Case Against Heparin Therapy of Intravascular Coagulation), *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 25 33:107(1974)。

- 30 已经显示施用重组人ala-TFPI(一种TFPI类似物)可以提高脓毒病动物模型的存活率。参见例如美国专利号6,063,764。作为内源性蛋白质,TFPI有很好的耐

受性。已经通过静脉内输注或皮下注射施用 TFPI 可以降低凝血能力，这如前凝血素时间(PT)增加所证明。在动物和人的研究中，PT 延长与血浆 TFPI 的增加呈线性相关。A. A. Creasey, 脓毒病 3:173(1999)。

本领域仍需要治疗方法能抑制严重性肺炎的致死效果，且同时将潜在的严重副作用减少到最低程度。

发明概述

本发明的一个实施方案是预防或治疗严重性肺炎的方法，包括通过连续静脉内输注将 TFPI 或 TFPI 类似物施用给严重性肺炎患者或有患病风险的人。一些实施方案中，患者患有可证实的感染。

本发明的另一个实施方案是治疗严重性肺炎的方法，包括通过连续静脉内输注将 TFPI 或 TFPI 类似物施用给患者。一些实施方案中，患者患有可证实的感染。

其它实施方案包括任一上述实施方案，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物是以一定的剂量率通过连续静脉内输注给予的，所述剂量率相当于以小于约 0.66mg/kg/hr 的剂量率施用参考 ala-TFPI。在优选的实施方案中，所述剂量率相当于以约 0.00025 到约 0.050mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI。在再优选的实施方案中，所述剂量率相当于以约 0.010 到约 0.045mg/kg/小时的剂量率施用参考 ala-TFPI。在更优选的实施方案中，所述 TFPI 或所述 TFPI 类似物是以一定的剂量率给予的，该剂量率相当于以约 0.025mg/kg/hr 的剂量率施用参 ala-TFPI。在其它优选的实施方案中，所述剂量率可使总剂量相当于以约 0.024 到约 4.8mg/kg 的总剂量施用参考 ala-TFPI。在另一个更优选的实施方案中，所述剂量率可使日剂量相当于以至少约 0.006mg/kg 且小于约 1.2mg/kg 的日剂量施用参考 ala-TFPI。

其它实施方案包括任何上述实施方案，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物施用至少 72 小时。在优选的实施方案中，所述 TFPI 或 TFPI 类似物施用至少 96 小时。

其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 类似物是未糖基化的 ala-TFPI。

其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 类似物包括由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 19-89 组成的第一个 Kunitz 结构域。在一个较佳实施方案中，所述 TFPI 类似物还包括由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 90-160 组成的第二个 Kunitz 结构域。

其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 类似物包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-160，或其中所述 TFPI 类似物包括由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 90-

160 组成的第二个 Kunitz 结构域。

其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物制备自包含 TFPI 或 TFPI 类似物的冻干组合物。

5 其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物作为含精氨酸的制剂施用。

其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物作为含柠檬酸的制剂施用。

10 其它实施方案包括任何上面的实施方案，其中所述 TFPI 或 TFPI 类似物在制剂中的浓度约为 0.15 mg/ml，包含约 300mM 盐酸精氨酸和约 20mM 柠檬酸钠，且 pH 约 5.5。

15 其它实施方案包括任何上面的实施方案，还包括在所述施用期或 24 小时内施用另外的试剂，试剂选自抗生素、抗体、内毒素拮抗剂、具抗凝血活性的组织因子类似物、免疫刺激剂、细胞粘附阻断剂、肝素、BPI 蛋白、IL-1 拮抗物、pafase (PAF 酶抑制剂)、TNF 抑制剂、IL-6 抑制剂和补体抑制剂。在一个较佳实施方案中，所述另外试剂是抗体，其中，所述与抗原特异结合的抗体选自 TNF、IL-6 和 M-CSF。

根据下列参考附图结合详细描述，本发明的更多实施方案是显然的。

发明详述

20 施用 TFPI 或 TFPI 类似物可有效防治严重性肺炎。连续低剂量施用 TFPI 或 TFPI 类似物(以后称为“低剂量 TFPI 施用”)也可有效防治严重性肺炎。施用 TFPI 或 TFPI 类似物，尤其是低剂量施用，可抑制或减轻急性或慢性炎症，尤其是严重性肺炎。当低剂量 TFPI 施用持续至少 3 天时，严重性肺炎的死亡率降低，同时因不良副作用产生并发症(尤其是出血性疾病)的速度也被降低。低剂量 TFPI 施用的再一个好处是可避免耐受效应，这样，在足够高的剂量下，可降低 TFPI 的血浆浓度。
25 在血浆 TFPI 浓度约为 850 ng/ml 时耐受效应最大，而低剂量 TFPI 施用的血浆水平通常保持在低于 500 ng/ml。低剂量 TFPI 施用通常通过连续静脉内输注 TFPI 或 TFPI 类似物进行。

TFPI 和 TFPI 类似物

30 “TFPI”在这里是指如 SEQ ID NO:1 所示含有 276 个氨基酸残基的成熟血清糖蛋白，其分子量约为 38,000 道尔顿。它是组织因子活性的天然抑制剂并因此活化

凝血。美国专利号 5,110,730 描述了组织因子(TF), 美国专利号 5,106,833 描述了 TFPI。TFPI cDNA 的克隆描述于 Wun 等, 美国专利号 4,966,852。TFPI 是一种蛋白酶抑制剂, 有 3 个 Kunitz 结构域, 已知其中两个可分别与因子 VII 和 Xa 反应。第三个结构域的功能还未知。据信 TFPI 通过形成一种惰性的 $X_a:TFPI:因子 VII_a:$ 组织因子的四因子复合物在体内发挥作用, 从而限制凝血过程的开始。参见 Rapaport, Blood 73:359-365(1989) 和 Broze 等, Biochemistry 29:7539-7546(1990) 的综述。TFPI 的许多结构特征可从它与其它充分研究的蛋白酶抑制剂的同源性来推断。TFPI 不是一个酶, 因此它可能以化学计量方式抑制其蛋白酶靶, 即一个 TFPI 的 Kunitz 结构域抑制一个蛋白酶分子。优选地, Kunitz 结构域 1 和/或 2 存在于本发明的 TFPI 分子中。Kunitz 结构域 3 的功能未知。

“TFPI 类似物”是一种 TFPI 的衍生物, 它通过一个或多个氨基酸添加或取代(通常保存其性质)、一个或多个氨基酸缺失(如 TFPI 片段)或在一个或多个氨基酸中加入一个或多个化学部分来修饰, 只要修饰未破坏 TFPI 的生物学活性。产生多肽类似物的方法在本领域已知且进一步描述于下面。一个优选 TFPI 类似物是 N-L-丙氨酰-TFPI(ala-TFPI), 其氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2。TFPI 类似物具有一些 TFPI 活性测度, 如下述生物活性测定所确定。一种 TFPI 和类似物的优选生物活性测定是前凝血素时间(PT)测定(如下)。

TFPI 和 TFPI 片段可被糖基化或不被糖基化。TFPI 类似物描述于美国专利号 5,106,833。Ala-TFPI 是 TFPI 类似物, 也已知为国际药物名“替法可近”(tifacogin)。Ala-TFPI 包括成熟、全长人 TFPI 的完整氨基酸序列加上氨基酸末端上的附加丙氨酸残酸。Ala-TFPI 的氨基末端丙氨酸残基被改造成 TFPI 序列, 以促进大肠杆菌表达, 并有效裂解另外会成为氨基末端甲硫氨酸残基的部分。参见美国专利号 5,212,091。

尤其优选的 TFPI 类似物包括保守性质的取代, 即取代发生在侧链相关的氨基酸类内。具体的是, 氨基酸一般分成四类: (1)酸性-天冬氨酸和谷氨酸; (2)碱性-赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3)非极性-丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸; (4)不带电荷的极性-甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被分类为芳族氨基酸。例如, 有理由预测用异亮氨酸或缬氨酸单独取代亮氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸、丝氨酸取代苏氨酸或类似的用结构相关氨基酸保守取代氨基酸对于生物活性没有大的效果。例如, 感兴趣的多肽可包括至约 1-70 个保守或

非保守氨基酸取代, 如 1、2、3、4、5、6-50、15-25、5-10 或任何 1-70 的整数, 只要所需分子功能保持完整。本领域技术人员可容易的确定感兴趣的分子区域, 可用具有如本文所述保持生物活性的合理可能性来修饰此区域。

“同源性”指两种多肽或两种多肽部分间的百分比相似性。当序列表现出至少
5 约 50%, 优选至少约 75%, 更优选至少约 80%-85%, 优选至少约 90%, 最优选至少约 95%-98%的序列同源性, 或具体范围间任何百分比同源性超过定义的分子长度时, 两种多肽序列彼此“充分同源”。如本文所用, “充分同源”也指表现出与具体多肽序列完全同一性的序列。

通常, “同一性”指分别对应两种多肽序列的精确氨基酸-氨基酸。直接比较两
10 种分子间的序列信息可确定百分比同一性: 通过排列序列、计算两种排列序列间配对的确切数目、除以较短序列的长度并将结果乘以 100。

优选的是, 天然或非天然产生的 TFPI 类似物具有的氨基酸序列与获得自 SEQ ID NO:1 的 TFPI 至少 70%、80%、85%、90%或 95%或更高同源。更优选的是, 分子是 98%或 99%同源。百分比同源性用 Smith-Waterman 同源性搜索算法确定, 使用仿射
15 间隔搜索的具有间隔开放罚分(gap open penalty)为 12, 间隔延伸罚分(gap extension penalty)为 2, BLOSUM 矩阵为 62。Smith-Waterman 同源性搜索算法教授于 Smith 和 Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482-489(1981)。

TFPI 和 TFPI 类似物的生物活性可通过前凝血素测定来确定。合适的前凝血素测定描述于美国专利 5, 888, 968 和 W0 96/40784。简言之, 前凝血素时间可用血凝
20 度计确定(如来自 Organon Teknika 的 Coag-A-Mate MTX II)。合适的测定缓冲液是 100mM NaCl、调至 pH7.5 的 50mM Tris, 含 1mg/ml 牛血清白蛋白。所需的另外试剂是正常人血浆(如 Organon Teknika 的“Verify 1”)、促凝血酶原激酶试剂(如 Organon Teknika 的“Simplastin Excel”)和 TFPI 标准溶液(如 20 μ g 的 100%纯 ala-TFPI(或其等效物)每 ml 测定缓冲液)。通过分析一系列 TFPI 标准溶液稀释的
25 凝固时间来获得标准曲线, 如范围从 1 到 5 μ g/ml 的终浓度。为确定凝固时间, 样品或 TFPI 标准首先稀释到测定缓冲液中。然后加入正常人血浆。加入促凝血酶原激酶试剂起始凝固反应。然后仪器记录凝固时间。线性 TFPI 标准曲线从 log 凝固时间相对 logTFPI 浓度的图获得。在 TFPI 标准纯度对应 100%纯标准的等效 TFPI 浓度基础上调节标准曲线。例如, 如果标准是 97%生化纯度的 ala-TFPI 制剂(即它
30 含 3%重量的无 TFPI 生物活性的分子种类), 各标准稀释的浓度乘以 0.97 得到实际 TFPI 浓度。因此, TFPI 标准在实际每 ml 97%纯制剂的重量基础上是 1.0 μ g/ml,

它相当于且处理为 1.0x0.97 浓度或 0.97 μ g/ml。

获得 TFPI 和 TFPI 类似物

用于本发明方法的 TFPI 和 TFPI 类似物可从细胞或组织中分离并纯化、化学合成或在原核或真核细胞中通过重组方法制造。

TFPI 可用一些方法分离。例如，分泌 TFPI 的细胞包括老化内皮细胞或 TNF 处理约 3 到 4 天的年轻内皮细胞以及肝细胞或肝脏肿瘤细胞。TFPI 可通过常规方法从此细胞培养物中纯化。例如，这些方法包括层析方法，描述于 Pedersen 等，1990, *J. of Biological Chemistry*, 265:16786-16793, Novotny 等，1989, *J. of Biological Chemistry*, 264:18832-18837, Novotny 等，1991, *Blood*, 78:394-400, Wun 等，1990, *J. of Biological Chemistry*, 265:16096-16101; Broze 等，1987, *PNAS (USA)*, 84:1886-1890。此外，TFPI 出现在血流中且可从血液中纯化，参见 Pedersen 等，同上。然而，需要大量血以获得足够量的 TFPI。

TFPI 或 TFPI 变体可用化学方法合成其氨基酸序列来产生，如用固相技术的直接肽合成法 (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge 等, *Science* 269, 202-204, 1995)。蛋白质合成可用手工技术或自动化进行。例如，用应用生物系统 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer) 可完成自动化合成。任选的是，TFPI 片段或 TFPI 变体可分别合成并用化学方法组合以产生全长分子。

TFPI 和 TFPI 类似物可如美国专利号 4,966,852 所示重组产生。例如，所需蛋白质的 cDNA 可掺入在原核或真核中表达的质粒。美国专利号 4,847,201 提供用具体 DNA 序列转化微生物和表达它们的细节。本领域普通技术人员已知许多其它参考文献，它们提供用微生物表达蛋白质的细节。许多文献被引用于美国专利号 4,847,201，如 Maniatis, T. 等，1982《分子克隆》(Molecular Cloning), Cold Spring Harbor Press。

多种技术可用于转化微生物并使用它们表达 TFPI 和 TFPI 类似物。下列仅是可能方法的例子。必须分离 TFPI DNA 序列并与适当对照序列相连。TFPI DNA 序列示于美国专利号 4,966,852 且可掺入质粒如 pUC13 或 pBR3822，它们可从公司商业购买如 Boehringer-Mannheim。一旦 TFPI DNA 插入载体，它可克隆到合适宿主中。可扩增 DNA 的技术例如示于 Mullis 的美国专利号 4,683,202 和 Mullis 等的美国专利号 4,683,195。可通过诱导细胞如肝脏肿瘤细胞(例如 HepG2 和 SKHep)产生 TFPI mRNA，然后鉴定和分离 mRNA 并将它逆转录以获得 TFPI 的 cDNA，由此获

得 TFPI cDNA。表达载体转化到宿主如大肠杆菌后，可发酵细菌并表达蛋白质。细菌优选是原核微生物且尤其优选大肠杆菌。用于本发明的优选微生物是大肠杆菌 K-12、菌株 MM294，由 ATCC 在布达佩斯条约规定下于 1984 年 2 月 14 日保存。它的登录号是 39607。

5 当然，也可能在真核宿主细胞培养物中表达编码多肽的基因，细胞培养物获得自多细胞生物体。参见例如《组织培养》(Tissue Culture)，1973，Cruz 和 Patterson 编，Academic Press。有用的哺乳动物细胞系包括鼠骨髓瘤 N51、VERO、海拉细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS、C127、Hep G2 和 SK Hep。TFPI 和 TFPI 类似物也可在杆状病毒感染的昆虫细胞中表达(也参见美国专利号 4,847,201；5,348,886
10 和 4,745,051)。同样参见 Pedersen 等，1990，J. of Biological Chemistry，265:16786-16793。用于真核细胞的表达载体通常包括启动子和与哺乳动物细胞相容的控制序列，例如普遍使用的猿病毒 40(SV40)早期和晚期启动子(Fiers 等，1878，Nature，273:113)，或其它病毒启动子如获得自多瘤病毒、腺病毒 2、牛乳头状瘤病毒或禽类肉瘤病毒，或免疫球蛋白启动子和热激启动子。哺乳动物细胞
15 宿主系统转化的一般方面由 Axel 描述，美国专利号 4,399,216，1983 年 8 月 16 日出版。现在似乎“增强子”区域在最优化表达中也是重要的；这些一般是在启动子区域上游发现的序列。如果需要，复制起点可从病毒来源获得。然而，整合到染色体是真核生物中 DNA 复制的普遍机制。植物细胞现在也可作为宿主，存在与植物细胞相容的控制序列如胭脂氨酸合酶启动子和多腺苷酸信号序列(Depicker，
20 A. 等，1982 J. Mol. Appl. Gen.，1:561)。转化植物细胞的方法和载体描述于 PCT 出版物 WO 85/04899，1985 年 11 月 7 日出版。

可用于纯化哺乳动物细胞中表达的 TFPI 和 TFPI 类似物的方法包括连续应用肝素-琼脂糖，MonoQ，MonoS 和反相 HPLC 色谱。参见 Pedersen 等，同上；Novotny 等，1989，J. Biol. Chem. 264:18832-18837，Novotny 等，1991，Blood，78:394-400，
25 Wun 等，1990，J. Biol. Chem. 265:16096-16101；Broze 等，1987，PNAS(USA)，84:1886-1890；美国专利号 5,106,833 和美国专利号 5,466,783。这些参考文献描述了多种纯化哺乳动物产生的 TFPI 的方法。

TFPI 也可用哺乳动物细胞宿主表达为重组糖基化蛋白质，如小鼠 C127 细胞 (Day 等，Blood 76:1538-1545，1990)、幼仓鼠肾细胞(Pedersen 等，1990)、中
30 国仓鼠卵巢细胞和人 SK 肝脏肿瘤细胞。C127 TFPI 用于动物研究并显示有效抑制兔中组织因子诱导的血管内凝血 (Day 等，同上)、防止狗中血栓溶解后动脉再阻

塞(Haskel 等, Circulation 84:821-827(1991))、以及减少狒狒中大肠杆菌脓毒病模型的死亡率(Creasey 等, J.Clin. Invest. 91:2850(1993))。Ala-TFPI 可用大肠杆菌宿主细胞表达为重组非糖基化蛋白质。所述方法通过体外再折叠大肠杆菌产生的重组蛋白来产生高活性 ala-TFPI。参见例如 WO 96/40784。

- 5 TFPI 和 TFPI 类似物也可在细菌或酵母中生产成随后纯化。通常, 可使用的方法示于美国专利号 5, 212, 091; 6, 063, 764 和 6, 103, 500 或 WO 96/40784。纯化、溶解和重折叠 ala-TFPI 和其它 TFPI 类似物可根据 WO 96/40784 和 Gustafson 等, Prot. Express. Pur. 5:233(1994), 本文纳入供参考。例如, 当根据 WO 96/40784 的实施例 9 制备时, 所得 ala-TFPI 制备物包含约 85%到 90%总蛋白重量是成熟、
- 10 适当折叠、生物活性 ala-TFPI, 约 10%到 15%具有一个或多个氧化甲硫氨酸残基。如前凝血素测定所确定, 这些氧化形式的生物活性与未衍生的 ala-TFPI 的生物活性相等, 且预期在本文所示发明中有活性。剩余物质包含多种 ala-TFPI 的修饰形式, 包括二聚化、聚集和乙酰化形式。

- TFPI 和 TFPI 类似物可有显著数量的半胱氨酸残基, 且美国专利号 4, 929, 700
- 15 所示方法与 TFPI 重折叠相关。TFPI 和类似物可通过多种层析方法从缓冲溶液中纯化, 如上面所述方法。另外, 可使用美国专利号 4, 929, 700 所示方法。可用于纯化 TFPI 和 TFPI 类似物的任何方法产生一定程度的纯度和一定水平的活性, 适用于施用给人。

20 治疗方法和组合物

通常, TFPI 和 TFPI 类似物可有效治疗或预防由于组织因子表达的正调节而使 TF 活性取决于 TNF、IL-1 或其他细胞因子而造成的疾病。施用 TFPI, 尤其是低剂量 TFPI 施用, 可降低患者中细胞因子如 IL-6 的浓度。低剂量 TFPI 施用通常可有效治疗炎症和血液凝固异常, 包括急性和慢性炎性症状, 如严重性肺炎。

25

“严重性肺炎”由美国胸协制订的方针定义。特别地, 严重性肺炎要求对肺炎进行诊断并存在 a) 两个主要标准之一, b) 三个次要标准之二, 或 c) 英国胸协(British Thoracic Society) 制订的四个标准之二(Thorax 2001; 56[增补本 IV]:1-64)。所述主要标准是: 1) 需要机械换气和 2) 脓毒病性休克, 或需要加压 4 小时以上。

30 次要标准是 1) 收缩压 $\leq$ 90mmHg, 2) 多叶肺炎, 以及 3) 低氧血标准($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) $<$ 250。英国胸协的标准是: 1) 呼吸率 $\geq$ 30 次/分钟, 2) 舒张压 $\leq$ 60mmHg, 3) 血尿氮

(BUN) > 7.0 mM (> 19.6 mg/dL) 和 4) 意思错乱。根据此领域的理解, 低氧血标准 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) 是指动脉氧占吸入的氧气的分压, 它说明了气体交换病损的水平。

优选地, 严重性肺炎患者可被此领域已知的任何方式感染。这些方法包括但不限于通过例如 GRAM 菌株、培养物、组织化学染色、免疫化学测定或核酸测定来检测血液或其他正常无菌体液或组织培养物中的病原生物。感染还可通过胸部 X 图像来证实, 其中包括肺炎的诊断, 这构成了全身性抗感染治疗以及任何感染临床症状的前提, 其中包括但不限于呼吸率的增加 ≥ 30 /分钟或 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$, 血压降低和体温升高。

10 TFPI 和 TFPI 类似物制剂

TFPI 和 TFPI 类似物的制剂优选通过静脉内输注施用。基本上优选连续的静脉内注注。完成此施用的方法对于本领域普通技术人员是已知的。输注可经中线或外周线进行。当要避免剂量率的大波动时, 短期偏离本发明的剂量率是可接受的, 只要所得施用 TFPI 的血浆水平在连续输注预期的 20% 内, 连续输注根据发明较佳实施方案以恒定剂量率进行。

施用给患者前, 配方制剂 (formulant) 可加入 TFPI 和 TFPI 类似物。优选液体制剂。TFPI 和 TFPI 类似物可以不同浓度配制, 在与 TFPI 蛋白施用途径、溶解性和稳定性相容的任何生理合适 pH 下使用不同配方剂。静脉内输注的优选制剂包括达约 0.6mg/ml 的 ala-TFPI、达 300mM 的盐酸精氨酸、pH5.0-6.0 的柠檬酸钠缓冲液。一些溶质如精氨酸、NaCl、蔗糖和甘露醇用于溶解和/或稳定 ala-TFPI。参见 WO 96/40784。尤其优选的静脉内输注制剂含约 0.15mg/ml 参考 ala-TFPI、300mM 盐酸精氨酸和 pH5.5 的 20mM 柠檬酸钠。TFPI 和 TFPI 类似物也可以达约 0.15mg/ml 的浓度配制, 这是在 150mM NaCl 和 20mM 柠檬酸钠或 pH5.5-7.2 的另一种缓冲液中, 任选具有 0.005% 或 0.01% (w/v) 聚山梨醇酯 80 (吐温 80)。其它制剂在 pH5.5 的 10mM 乙酸钠中含达约 0.5mg/ml TFPI 或 TFPI 类似物, 乙酸钠中含 150mM NaCl、8% (w/v) 蔗糖或 4.5% (w/v) 甘露醇。TFPI 和 TFPI 类似物也可用高盐以高达几个 mg/ml 的浓度配制。例如, 在 500 mM NaCl 和 20 mM 磷酸钠 (pH7.0) 中, 一种制剂含达约 6.7mg/ml ala-TFPI。

用于 TFPI 和 TFPI 类似物的更多配方剂例子包括油、聚合物、维生素、碳水化合物、氨基酸、盐、缓冲液、白蛋白、表面活性剂或膨胀剂。优选碳水化合物包括糖或糖醇如单、二或多糖或水溶性葡聚糖。糖类或葡聚糖可包括果糖、右旋糖、

乳糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、右旋糖苷、支链淀粉、糊精、 α 和 β 环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素或它们的混合物。最优选蔗糖。糖醇定义为具有-OH 基团的 C_4 - C_8 烃，且包括半乳糖醇、肌醇、甘露醇、木糖醇、山梨糖醇、甘油和阿拉伯糖醇。最优选甘露醇。上述这些糖或糖醇
5 可单独或组合使用。用量没有限制，只要糖或糖醇可溶于含水制备物中。糖或糖醇浓度优选在 1.0 w/v% 和 7.0 w/v% 间，更优选在 2.0 w/v% 和 6.0 w/v% 间。

优选的氨基酸包括左旋(L)形式的肉碱、精氨酸和甜菜碱；然而可加入其它氨基酸。优选的聚合物包括平均分子量在 2000 和 3,000 间的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或平均分子量在 3,000 和 5,000 间的聚乙二醇(PEG)。同样优选使用组合物中的缓
10 冲液使冻干前或重建后溶液的 pH 变化成极小。可使用大部分任意生理缓冲液，但优选柠檬酸、磷酸、琥珀酸和谷氨酸缓冲液或它们的混合物。缓冲液浓度优选从 0.01 到 0.3 摩尔。可加入制剂的表面活性剂示于 EP 号 270,799 和 268,110。

另外，可化学修饰 TFPI 和 TFPI 类似物，例如通过共价缀合到聚合物以增加其循环半衰期。优选的聚合物和使它们附于肽的方法示于美国专利号 4,766,106、
15 4,179,337、4,495,285 和 4,609,546。优选的聚合物是聚氧乙烯化多元醇和聚乙二醇(PEG)。PEG 在室温可溶于水且具有通式： $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ ，其中 R 可以是氢或保护性基团如烷基或烷醇基团。保护性基团优选有 1 到 8 个碳，更优选它是甲基。符号 n 是正整数，优选 1 和 1,000 间，更优选 2 和 500 间。PEG 的平均分子量优选在 1000 和 40,000 间，更优选 2000 和 20,000 间，最优选 3,000 和 12000
20 间。PEG 优选有至少一个羟基，更优选它是一个末端羟基。此羟基被优选活化以与抑制剂上的游离氨基反应。然而，要理解的是可改变反应基团的类型和量以获得本发明共价共轭的 PEG/TFPI。

水溶性聚氧乙烯化多元醇也用于本发明。它们包括聚氧乙烯化山梨糖醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油(POG)等。优选 POG。一个原因是聚氧乙烯化甘油的甘油主链与例如动物和人的甘油一、二、三酸酯中天然产生的主链相同。因此，
25 该分支不一定看成体内的外来试剂。POG 的优选分子量范围与 PEG 相同。POG 结构示于 Knauf 等，1988，J. Biol. Chem. 263:15064-15070，POG-蛋白质缀合物的讨论发现于美国专利号 4,766,106，本文全部纳入供参考。

液体药物组合物被制备后，可冻干以防止降解并保持无菌。冻干药物组合物的
30 方法对于本领域普通技术人员是已知的。组合物仅在使用前用无菌稀释液重建(例如林格溶液、蒸馏水或无菌盐水)，稀释液可包括另外的成分。重建后，组合物优

选通过连续静脉内输注施用给受试者。

TFPI 和 TFPI 类似物的剂量

TFPI 或 TFPI 类似物是以有效治疗和预防严重性肺炎的浓度施用的。这也对其
5 他急性或慢性感染，以及细胞因子正调节组织因子表达的常规疾病有效。为实现
这一目的，TFPI 或 TFPI 类似物优选静脉内施用。实现这种施用的方法是精通此领
域的技术人员熟知的。通常，TFPI 或 TFPI 类似物的给药剂量在 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 至 20mg/kg
之间，更优选在 $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ 至 15mg/kg 之间，最优选在 1 至 10mg/kg 之间。

上述剂量一般是在至少约 1 天的时间内施用的，通常要几天，这样就可以统计
10 以单剂量或均分剂量给予宿主的总日剂量，例如，每天每千克体重约 2-15 毫克，
优选约 $4\text{--}10\text{mg/kg}$ 。剂量单位组合物可含有上述量或其因数以构成日剂量。较低的
日剂量可用于预防或其他目的，如约 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 至 2mg/kg 。活性成分的量可与载体
物质相结合以制得单剂量形式，这将根据被治疗患者的状况和特定治疗模式而定。

无论采用何种药物输递系统以及无论所述化合物是否作为药物组合物的一部分
15 施用，给药方案都需根据各种因素来选定，其中包括患者的类型、年龄、体重、
性别、饮食状况和身体状况，症状的严重性，给药途径，药理学情况，如活性、
有效性、药代动力学和毒理学特征。因此，实际采用的给药方案可变性很大，因
此可能与上述优选的给药方案差别很大。优选地，TFPI 或 TFPI 类似物的剂量不能
超过 $\alpha\text{la-TFPI } 0.66\text{ mg/kg/小时}$ 的剂量率。

20

低剂量施用

当 TFPI 和 TFPI 类似物给予的剂量率相当于以至少约 0.00025mg/kg/小时
($0.00417\text{ }\mu\text{g/kg/分钟}$)和小于约 0.050mg/kg/小时 ($0.833\text{ }\mu\text{g/kg/分钟}$)的剂量率
施用参考 $\alpha\text{la-TFPI}$ 时，治疗脓毒病和其它炎症情况的功效被保持且不利副作用如
25 出血被减至最低程度。为最佳结合功效和安全，剂量率优选相当于以至少约
 0.010mg/kg/小时 ($0.167\text{ }\mu\text{g/kg/分钟}$)和小于约 0.045mg/kg/小时 ($0.833\text{ }\mu\text{g/kg/分钟}$)
的剂量率施用参考 $\alpha\text{la-TFPI}$ ，或相当于以至少约 0.020mg/kg/小时 和小于约
 0.040mg/kg/小时 的剂量率施用参考 $\alpha\text{la-TFPI}$ ，最优选相当于以约 0.025mg/kg/小时
($0.417\text{ }\mu\text{g/kg/分钟}$)的剂量率施用参考 $\alpha\text{la-TFPI}$ 。施用途径一般是静脉内施用，
30 优选连续静脉内输注。输注可施用至少约 72、96、120 或 240 小时。连续输注优
选施用 3 到 8 天，更优选 3 到 6 天，最优选约 4 天。

“通过连续输注”施用是指输注维持在接近指定速度而没有显著中断大部分规定的持续时间。另外，可使用间歇的静脉内输注。如果使用间歇输注，然后应使用时间平均的剂量率，此速度相当于上述连续输注所用剂量率。此外，间歇输注的程序必须使最高血清浓度不比使用输注所得最高浓度大约 20%。为避免患者的不利反应，具体是包括出血的副作用，剂量率应小于的速度相当于以约 0.050mg/kg/小时连续静脉内输注参考 ala-TFPI。

所有本文所述剂量包括剂量率和总剂量，在实践中受到至多 10%的变化，由于定量测定中无法避免不精确如前凝血素测试中的蛋白质浓度和生物活性。即任何实际施用剂量比本文所述剂量至多高 10%或低 10%被认为是在所述剂量范围内。由于此原因，所有剂量表示为“大约”一个具体剂量。例如，描述为“约 0.025mg/kg/小时”的剂量被认为相当于范围从 0.0225 到 0.0275 mg/kg/小时的任何实际剂量。

如果继以低剂量 TFPI 施用，推注注射或 TFPI 或 TFPI 类似物的短暂较高的输注速度也可在本发明实践中使用。例如，推注注射或较高灌输速度可用于减少患者循环中施用 TFPI 或 TFPI 类似物的平衡时间。这样做，可更迅速达到最终稳态的 TFPI 血浆水平，TFPI 受体可更快饱和。以约 0.025 mg/kg/小时施用参考 ala-TFPI 给人 2 小时使 TFPI 血浆水平(加 ala-TFPI)从约 80ng/ml 增加到约 125ng/ml，或增加约 50%。如果提高输注速度或使用推注注射，可更快达到相同水平。如果输注持续到获得稳态，较高输注速度会产生较高水平。在脓毒病患者中，以约 0.050 mg/kg/小时施用参考 ala-TFPI 的稳态水平是约 300 ng/ml，以约 0.33 或约 0.66mg/kg/小时施用参考 ala-TFPI 的稳态水平是至少约 2 μ g/ml。

以单次连续输注或分开输注施用给受体的总日剂量可例如相当于施用至少约 0.006mg/kg/天到小于约 1.2mg/kg/天的参考 ala-TFPI，更常相当于施用至少约 0.24mg/kg/天到小于约 1.2mg/kg/天的参考 ala-TFPI，优选相当于约 0.6 mg/kg/天的参考 ala-TFPI。此范围内的更低剂量可用于预防或其它目的。发明的剂量方案也可表示为施用给患者的总剂量。总剂量是输注速度和总输注时间的数学乘积。例如，在优选剂量率约为 0.025mg/kg/小时参考 ala-TFPI 和优选输注时间为 96 小时时，总剂量约为 2.4 mg 参考 ala-TFPI 每 kg 体重。根据发明施用的 TFPI 总剂量相当于至少约 0.75 μ g/kg 和小于约 4.8mg/kg 的参考 ala-TFPI。总剂量优选相当于至少约 1mg/kg 和小于约 4.8mg/kg 的参考 ala-TFPI。总剂量更优选相当于至少约 2.4mg/kg 的参考 ala-TFPI。

一个可用于调节剂量方案的因素是单个患者的凝血功能，通常用前凝血素时间

(PT)测定或国际标准化比例(INR)测量。INR 是 PT 测定的标准化,其中测试根据国际参考促凝血酶原激酶试剂来校准。参见例如 R.S.Riley 等, J.Clin.Lab. Anal. 14:101-114(2000)。健康人类志愿者中 INR 对 ala-TFPI 的反应在所见血浆浓度范围上大致为线性(图 3)。INR 的总变化是 1.2 个单位每 $1\mu\text{g/ml}$ 血浆 ala-TFPI 浓度增加。

在药代动力学模型中,对 ala-TFPI 的 INR 应答最好用 log-线性模型描述,其中 log INR 与 TFPI 血浆浓度呈线性相关。应答的 log-线性特性意味着 INR 基线升高的受试者比具有较低基线值的受试者可能耐受更多抗凝血药,后者有类似的循环 sIs-TFPI 水平。

上述剂量方案包括以 mg/kg/小时 为基础的剂量率和总日剂量,表示为“相当于施用参考 ala-TFPI”的剂量。这是指它们通过标准化到“参考 ala-TFPI”剂量来定量确定,“参考 ala-TFPI”剂量定义为成熟、100%纯(在蛋白质基础上)、适当折叠、生物活性、非糖基化 ala-TFPI。Ala-TFPI 是氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2 的 TFPI 类似物。其它形式的 TFPI 也可用于发明,包括成熟、全长 TFPI 和其类似物。为确定用除了 ala-TFPI 的 TFPI 形式和 ala-TFPI 制剂或另一个小于 100%纯的 TFPI 类似物实践发明的适当剂量范围,本文所述参考 ala-TFPI 的剂量范围可在 TFPI 具体形式的内在生物活性的基础上调节,且在制剂的生化纯度基础上进一步调节。

TFPI 或 TFPI 类似物的内在生物活性指成熟、100%纯、适当折叠 TFPI 或 TFPI 类似物的特异活性,如前凝血素测定所定义。因此等效剂量计算为(参考 ala-TFPI 剂量)/((相对内在活性) $\times$ (生化纯度)),其中相对内在活性指(类似物的内在活性)/(参考 ala-TFPI 的内在活性)。例如,如果具体 TFPI 类似物的内在生物活性是参考 ala-TFPI 的 80%,将参考 ala-TFPI 的剂量值除以 0.8 得到具体 TFPI 类似物的等效剂量。此外,如果施用给患者的制剂是例如仅 90%生化纯度即包含 10%缺乏 TFPI 生物活性的分子种类,通过将剂量值除以 0.9 对 ala-TFPI 的参考剂量值进行另外修正。因此,对于具有 80% ala-TFPI 的内在活性且以 90%生化纯度施用的假定 TFPI 类似物,相当于以 0.025mg/kg/小时 施用参考 ala-TFPI 的剂量率为 0.0347mg/kg/小时 (即 $0.025/(0.8 \times 0.9)$)。

也可通过相对生物活性来确定具体制剂的等效剂量而不需知道内在活性或生化纯度。相对生物活性可使用前凝血素时间测定通过比较 TFPI 类似物具体制剂与 TFPI 生物活性标准来确定。例如,根据 WO 96/40784 实施例 9 的方法产生的

ala-TFPI 含约 85%生物活性 ala-TFPI 分子种类，可用作 TFPI 生物活性标准。在前凝血素测定中，根据 WO 96/40784 实施例 9 的方法产生的 ala-TFPI 具有约 85%的参考 ala-TFPI 的活性。在前凝血素时间标准曲线作图时，凝固时间的对数相对 TFPI 浓度的对数作图。如果 TFPI 生物活性标准具有 85%的参考 ala-TFPI 的活性，
5 若作图前 TFPI 生物活性标准浓度乘以 0.85，可制成相当于参考 ala-TFPI 的标准曲线，从而绘出的活性相当于 100%纯参考 ala-TFPI 的活性。当具体 TFPI 类似物制剂的凝固时间与标准曲线比较时，可从曲线读出参考 ala-TFPI 的等价浓度。另外，如果通过线性回归分析获得标准曲线的线性部分的斜率，斜率可在 TFPI 生物活性标准相对参考 ala-TFPI 的活性基础上修正。因此具体 TFPI 类似物制剂的相对生物活性相当于参考 ala-TFPI 活性与类似物制剂活性的比例。例如，如果具体类似物需要 $1.43 \mu\text{g}$ 以产生与 $1.00 \mu\text{g}$ 参考 ala-TFPI 相同的前凝血素时间活性，类似物制剂的相对生物活性是 $1.00/1.43$ 或 0.7 。对于此类似物制剂，将参考 ala-TFPI 剂量除以类似物制剂的相对生物活性得到参考 ala-TFPI 的等效剂量。例如， 0.025mg/kg/小时 的参考 ala-TFPI 剂量相当于 0.0357mg/kg/小时 的类似物制剂(即 $0.025/0.7$)。
15

尽管 TFPI 和 TFPI 类似物可作为单独活性抗凝血药剂施用，它也可与一种或多种另外的治疗剂组合使用。这些另外的治疗剂包括用于治疗严重性肺炎的抗体，例如抗内毒素、单克隆抗体(如结合内毒素的Mabs)和抗 TNF 产物如抗 TNF 的鼠 Mab。TFPI 和 TFPI 类似物也可结合白介素-1 受体拮抗剂、杀菌/渗透性增加(BPI)蛋白质、免疫刺激剂、具抗炎症活性的化合物如 PAF 拮抗剂以及细胞粘附阻断剂(例如抗血小板剂如 GPIIb/IIIa 抑制剂)。当组合施用时，治疗剂可作为在相同或不同时间给予的单独组合物配制，或治疗剂可作为单组合物给予。优选地，其它治疗剂是同时(即在施用 TFPI 或 TFPI 类似物同时)或在施用 TFPI 或 TFPI 类似物 24 小时之内(即在开始施用 TFPI 或 TFPI 类似物前 24 小时之内，或在结束施用 TFPI 或
20 TFPI 类似物后 24 小时之内)给予的。其它治疗剂也可和 TFPI 或 TFPI 类似物一起作为单独的组合物给予。
25

TFPI 和 TFPI 类似物可联合其它有效治疗严重性肺炎的试剂。例如，下列可联合 TFPI 和 TFPI 类似物施用：能治疗潜在细菌感染的抗生素；针对抗细菌细胞壁成分的单克隆抗体；可和参与严重性肺炎途径的细胞因子形成复合物的受体；以及一般任何试剂或蛋白质，它们可与细胞因子或补体蛋白质相互作用以减少它们的效果并削弱严重性肺炎和/或其症状。
30

用于本发明的抗生素包括一般类别的抗生素： β -内酰胺环(青霉素)、糖苷键中的氨基糖(氨基糖苷)、大环内酯环(大环内酯)、并西苯羧酰胺(氨甲酰并四苯(naphthacenecarboxamide)的多环衍生物(四环素)、二氯乙酸硝基苯衍生物、肽(杆菌肽、短杆菌肽和多粘菌素)、具缀合双键系统的大环(多烯)、获得自磺胺的磺胺类药物(磺胺药物)、5-硝基-2-咪喃基(硝基咪喃)、喹啉羧酸(萘啶酸)和许多其它抗生素。其它抗生素和上面具体抗生素的更多形式可发现于《化学技术百科全书》(Encyclopedia of Chemical Technology), 第3版, Kirk-Othmer(编), 第2卷, 782-1036页(1978)和第3卷, 1-78页, Zinsser, 《微生物学》(Microbiology), 第17版, W. Joldik等, (编), 235-277页(1980), 或《Dorland图解医学辞典》(Dorland's Illustrated Medical Dictionary), 第27版, W. B. Saunders Company(1988)。

其它可结合 TFPI 和 TFPI 类似物的试剂包括内毒素拮抗剂如 E5531(一种脂质 A 的类似物, 参见 Asai 等, Biol. Pharm. Bull. 22:432(1999)); 具抗凝血活性的 TF 类似物(参见例如 Kelley 等, Blood 89:3219(1997) 和 Lee&Kelley, J. Biol. Chem. 273:4149(1998)); 针对参与脓毒病途径的细胞因子的单克隆抗体, 如针对 IL-6、M-CSF 的单克隆抗体, 参见 Creasey 等于 1989 年 12 月 15 日提交的美国序列号 07/451,218, 以及针对 TNF 的单克隆抗体, 参见 Cerami 等, 美国专利号 4603,106; 从产生 TNF 激素原的细胞中切割成熟 TNF 激素原的蛋白质抑制剂, 参见 Kriegler 等。于 1989 年 8 月 16 日提交的美国序列号 07/395,253; IL-1 的拮抗剂, 如 Haskili 等于 1990 年 5 月 1 日提交的美国序列号 07/517,276 所示; IL-6 细胞因子表达的抑制剂例如抑制素, 如 Warren 等于 1999 年 8 月 24 日提交的美国专利号 5,942,220; 以受体为基础的多种细胞因子的抑制剂如 IL-1。可使用补体或补体的蛋白质抑制剂的抗体, 如 CR₁、DAF 和 MCP。

本说明书中提到的所有专利、专利申请和参考资料在此全文并入以供参考。

现在通过以下例子阐述本发明, 例子列出具体有利的实施方案。然而, 应指出这些实施方案是说明性的, 不用于以任何方式限制发明。

实施例

实施例 1. 用 Ala-TFPI 治疗严重性肺炎患者

评价严重性肺炎患者以在基本相同的组中研究用 ala-TFPI 治疗的潜在效果。如果调查人员证明一项脓毒病来源为肺炎则可断定为肺炎患者。可以有其它感染

位点。由于难以区别化学药品后遗症的影响，故未包括吸入性肺炎患者。按培养物阳性(任何感染证据，如培养物或革兰氏菌株)或培养物阴性(阴性培养物或未处理的培养物)将肺炎患者归类。通过连续静脉内输注在大肠杆菌中表达的未糖基化的 ala-TFPI 制品治疗患者，施用剂量为 0.025mg/kg/h，该制品配制在含 300 mM L-精氨酸、20 mM 柠檬酸钠，pH 5.5 的缓冲液中，其渗量为 560 +/-110 mOsm。以相同速度输注含相同缓冲液但不含 ala-TFPI 的安慰剂作为研究药物。分析结果证实，用 ala-TFPI 治疗阳性培养物肺炎患者是有效的(表 1)。那些没有感染源证据的患者被证明是无效的。

表 1. 肺炎指标—死亡率

INR≥1.2	全部		
	安慰剂	TFPI	p=
阳性肺炎培养物			
(N=)	236	268	
死亡率	39.8%	31.3%	0.05
阴性肺炎培养物			
(N=)	118	122	
死亡率	30.5%	45.1%	0.02

10

表 2. 低 INR 肺炎指标—死亡率

INR<1.2	全部		
	安慰剂	TFPI	p=
阳性肺炎培养物			
(N=)	33	22	
死亡率	30.3%	13.6%	0.15
阴性肺炎培养物			
(N=)	25	23	
死亡率	32.0%	8.7%	0.08

高 INR 阴性培养物组升高的死亡率似乎出现在有或没有额外施用肝素的患者群体中，尽管需要注意的是，阴性肺炎培养物的非肝素组中受试者数目相对较少(表 3)。在阳性培养物/无肝素组中观察到强积极治疗效果。

表 3. 肺炎指标—死亡率和肝素

INR $\geq$ 1.2	肺炎培养物阳性			肺炎培养物阴性		
	安慰剂	TFPI	p=	安慰剂	TFPI	p=
基线或治疗期间有肝素						
(N=)	160	187		87	85	
死亡率	32.5%	31.6%	0.84	36.8%	56.5%	0.01
基线或治疗期间无肝素						
(N=)	76	81		31	37	
死亡率	55.3%	30.9%	0.002	32.3%	48.6%	0.17

实施例 2. 研究疾病变化的基线严格性(severity)

- 评价了许多疾病变化的基线严格性,以确定是否可用组间不平衡来解释观察到的结果。这些数据说明,这些结果的差异与培养物状况有关不是由于基线不平衡。因此,这些结果似乎代表了 TFPI 治疗的不同效果,这是由于被感染或未被感染患者的生物学差异造成的。无论在经 TFPI 处理的阴性肺炎培养物组中严格性指标(例如 APACHE II 记分或器官功能障碍记分)等于安慰剂或较低,阴性培养物组证实有最高的总死亡率(表 4)。

10 表 4. 肺炎指标—疾病的基线严格性

INR $\geq$ 1.2	阳性肺炎培养物		阴性肺炎培养物	
	安慰剂	TFPI	安慰剂	TFPI
N=	236	268	118	122
死亡率比例	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
平均器官功能障碍	3.0	3.0	3.0	2.9
CV-低血压	79%	74%	73%	72%
酸中毒	66%	66%	64%	58%
少尿	42%	48%	47%	49%
肺功能障碍	93%	91%	91%	90%
血小板减少	20%	23%	22%	16%

IL-6 是在脓毒病早期升高的炎性细胞因子，它反应了炎性应答的强度且与结果有关。在基线时，IL-6 水平在临床上证实患有肺炎但无感染证据的患者中较低（表 5）。这说明经证实带有肺炎感染源的患者与无明显感染源的患者之间是有生物学差异的。奇怪的是，阴性 TFPI 培养物组有最低的基线 IL-6 水平，但有最高的死亡率。在脓毒病群体中，IL-6 水平随时间降低。IL-6 降低的速度在经 TFPI 治疗的阴性肺炎培养物个体中下降（表 5）。这说明 TFPI 的生物效应在被感染或未被感染的患者中可能是不同的。

表 5. 肺炎指标—IL-6

INR≥1.2 肺炎	基线			6 小时（% Δ*）			24 小时（% Δ*）			96 小时（% Δ*）		
	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=
阳性培养物 (n=493)	494	489	0.96	-25%	-27%	0.75	-57%	-63%	0.26	-83%	-84%	0.69
阴性培养物 (n=236)	300	195	0.11	-21%	-8%	0.08	-54%	-32%	-0.03	-98%	-97%	0.06

*% Δ = 相对基线变化的百分比(几何平均数)

实施例 3. 用经证实的感染类型分析严重性肺炎患者

如上所述，在最可能被感染的患者（即血液培养物呈阳性的患者）中观察了 ala-TFPI 治疗的总功效。在用经证实的感染类型分析严重性肺炎患者时，在血液培养物呈阳性的个体和具有其他证据的患者中观察了 ala-TFPI 治疗的功效（表 6）。该效果在细菌组，即最可能被感染或有最强感染源的患者中最强。

表 6. 培养物指标和肺炎指标—死亡率

INR≥1.2	血液培养物阳性			其他培养物阳性			培养物阴性/ND		
	PL	TFPI	p=	PL	TFPI	p=	PL	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

如上所示，在没有肝素时，被感染的患者（血液+“其他”）可从 TFPI 治疗中受益。该结果最可能是由于肺炎组的益处（表 7）。这一发现似乎说明，内源抗凝血药对严重性肺炎感染患者的好处最大。

表 7. 感染指标、肺炎指标—死亡率，使用肝素

INR $\geq$ 1.2	肝素			无肝素		
	安慰剂	TFPI	p=	安慰剂	TFPI	p=
被证实感染（血液+“其他”）						
N=	433	442		211	207	
死亡率	31.4%	31.9%	0.89	43.1%	32.4%	0.02
肺炎（培养物阳性）						
N=	160	187		76	81	
死亡率	32.5%	31.6%	0.84	55.3%	30.9%	0.002
非肺炎感染（被证实最不可能是肺炎）						
N=	273	255		135	126	
死亡率	30.8%	32.2%	0.73	36.3%	33.3%	0.62

为进一步限制异质性，进一步的试验可集中在社会获得性肺炎(CAP)。在医院中患上肺炎的患者（医院肺炎）更可能用来收集病原生物，并具有其他使对感染性肺炎的诊断更加困难的肺部疾病。此外，与非医院肺炎患者相比，CAP 患者暴露于肝素的可能性较小。当用治疗前住院时间的长短来分析数据时，需要注意住院 ≤ 2 天的培养物阳性患者（社会获得性肺炎）和住院超过 2 天的患者（医院肺炎）有类似的益处。培养物阴性患者中的不良效果主要在医院肺炎组中观察到(表 8)。

10 表 8. 肺炎指标—死亡率以及住院时间

INR $\geq$ 1.2	肺炎培养物阳性			肺炎培养物阴性		
	安慰剂	TFPI	p=	安慰剂	TFPI	p=
社会获得性肺炎（ ≤ 2 天）						
(N=)	121	143		61	52	
死亡率	38.8%	29.4%	0.10	27.9%	30.8%	0.74
医院肺炎（ > 2 天）						
(N=)	115	125		57	70	
死亡率	40.9%	33.6%	0.24	33.3%	55.7%	0.01

然而，本专利申请想要涵盖的变化和取代可由本领域技术人员进行而不背离所附权利要求的精神和范围。

<110> 希龙公司(Chiron Corporation)

<120> 通过施用组织因子途径抑制剂(TFPI)治疗严重性肺炎

<130> 012441.00029

<150> US 60/328,806

<151> 2001-10-15

<160> 2

<170> FastSEQ, Windows 版本 4.0

<210> 1

<211> 276

<212> PRT

<213> 智人(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
Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
      180            185            190
Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn

```

195	200	205
Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg	Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly	
210	215	220
Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser	Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys	
225	230	235
Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser	Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys	
245	250	255
Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val	Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe	
260	265	270
Val Lys Asn Met		
275		

<210> 2
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2
 Ala Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu
 1 5 10 15
 Leu Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp
 20 25 30
 Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe
 35 40 45
 Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln
 50 55 60
 Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln 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											