



공개특허 10-2022-0022828



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0022828
(43) 공개일자 2022년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인 아스트라제네카 아베 스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제
A61K 38/46 (2006.01) A61K 31/4365 (2006.01)	
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/7064 (2006.01)	
A61K 45/06 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)	
(52) CPC특허분류 A61K 38/46 (2013.01) A61K 31/4365 (2013.01)	(72) 발명자 칼슨, 레이프 스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제 아스트라제네카 아베
(21) 출원번호 10-2020-0150157	나일랜더, 스벤 스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제 아스트라제네카 아베
(22) 출원일자 2020년11월11일	(30) 우선권주장 (뒷면에 계속) (74) 대리인 장덕순, 류현경
심사청구일자 없음	63/067,388 2020년08월19일 미국(US)

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 조합 치료

(57) 요 약

본 발명은 재조합 아피라제 단백질을 P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여함으로써 환자에서의 허혈성 사건, 특히 ST-분절 상승 심근 경색 및 급성 허혈성 뇌졸증을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/7064 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 9/10 (2018.01)
C12Y 306/01005 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

페일스트롬, 올라
스웨덴 에스오-151 85 쇠더탈제 아스트라제네카 아
베

배디먼, 리나

스페인 08025 바르셀로나 아베니다 산 안토니 엠.
클라레트 167 인스티튜트 카탈라 데 시엔시에스 카
르디오바스쿨라스

명세서

청구범위

청구항 1

환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법으로서, P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법에 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질로서, 방법은 환자에게 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함하고, 재조합 아피라제 단백질은 P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여되는 것인, 재조합 아피라제 단백질.

청구항 3

환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법에 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제로서, 방법은 환자에게 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 것인, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 4

환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법에 사용하기 위한 P2Y₁₂ 억제제로서, 방법은 환자에게 P2Y₁₂ 억제제를 투여하는 단계를 포함하며, P2Y₁₂ 억제제는 재조합 아피라제 단백질과 함께 투여되는 것인, P2Y₁₂ 억제제.

청구항 5

제1항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 방법은 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제를 환자에게 동시에 투여하는 단계, 또는 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제를 환자에게 순차적으로, 선택적으로 동일한 날에, 투여하는 단계를 포함하는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 6

제5항에 있어서, 방법은

- a. 재조합 아피라제 단백질을 환자에게 투여한 후, P2Y₁₂ 억제제를 순차적으로 투여하는 단계; 또는
- b. P2Y₁₂ 억제제를 환자에게 투여한 후, 재조합 아피라제 단백질을 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 7

제1항, 제5항 또는 제6항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 재조합 아피라제 단백질은 P2Y₁₂ 억제제가 환자에게 투여된 후 24시간 이내 또는 12시간 이내에 환자에게 투여되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 8

제1항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 방법은 재조합 아피라제 단백질이 P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여된 후 적어도 24시간 후에 시작하는, 환자에게의 P2Y₁₂ 억제제의 적어도 매일 투여를 추가로 포함하고, 선택

적으로 이러한 매일 투여는 적어도 1개월, 적어도 2개월, 또는 적어도 6개월 동안 지속되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 9

제1항 및 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러, 클로피도그렐, 티클로피딘, 프라수그렐, 및 칸그렐러로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 10

제9항에 있어서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 11

제1항 및 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 1의 위치 49 내지 485와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 CD39L3 단백질인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 12

제11항에 있어서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 1의 위치 49 내지 485에 기재된 아미노산 서열을 갖는 기준 CD39L3 단백질과 비교하여 하나 이상의 변형을 포함하고, 변형은 기준 아피라제와 비교하여 증가된 ADP아제 활성을 초래하거나, 또는 상기 변형은 기준 아피라제와 비교하여 감소된 ATP아제 활성과 조합된 기준 아피라제와 동일한 ADP아제 활성을 초래하는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 재조합 아피라제 단백질은 기준 CD39L3 단백질과 비교하여 위치 67 및 69에서 치환을 포함하고, 이때, 위치는 서열번호 1에 따라 넘버링되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 14

제13항에 있어서, 위치 67에서의 치환은 글리신으로의 치환이고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 15

제1항 및 제5항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 16

제1항 및 제5항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 재조합 아피라제 단백질은 10 mg 내지 1000 mg의 용량으로 투여되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 17

제1항 및 제5항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서,

- a. P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐리이고, 60 내지 200 mg의 용량, 선택적으로 180 mg으로 투여되거나;
- b. P2Y₁₂ 억제제는 클로피도그렐이고, 75 내지 600 mg의 용량, 선택적으로 300 mg 또는 600 mg으로 투여되거나;
- c. P2Y₁₂ 억제제는 티클로피딘이고, 250 내지 500 mg의 용량, 선택적으로 500 mg으로 투여되거나;
- d. P2Y₁₂ 억제제는 프라수그렐이고, 5 내지 60 mg의 용량, 선택적으로 60 mg으로 투여되거나; 또는
- e. P2Y₁₂ 억제제는 칸그렐리이고, 정맥 내 볼루스 kg당 30 μg의 용량으로 투여된 후, 정맥 내 주입 분당 4 μg/kg으로 투여되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 18

제1항 및 제5항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 방법은 아스피린을 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 아스피린은 50 내지 325 mg으로 투여되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 19

제1항 및 제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 허혈 사건은 급성 허혈성 뇌졸중 또는 일과성 허혈 발작인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 20

제1항 및 제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 방법, 또는 제2항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제로서, 허혈 사건은 급성 관상동맥 증후군인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 21

제20항에 있어서, 허혈 사건은 ST 세그먼트 상승 심근 경색(STEMI)인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 재조합 아피라제 단백질은 허혈 사건의 개시 후 24시간 이하, 또는 12시간 이하, 또는 6시간 이하 후에 P2Y₁₂ 억제제와 함께 환자에게 투여되는 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 재조합 아피라제 단백질을 P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여하는 단계 후에 48시간 미만, 24시간 미만, 12시간 미만, 6시간 미만 후에 환자에 대해 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법을 수행하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법은 경피적 관상동맥 중재술(PCI), 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법인 것인, 방법 또는 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하여 환자에서 허혈 사건, 특히 ST 세그먼트 상승 심근 경색 및 급성 허혈 뇌졸중을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

심근 경색(MI)은 전 세계적으로 병원 입원과 사망의 주요 원인이다(Asaria et al. 2017). 치료하지 않고 방치하면 MI는 혈류 부족(허혈)과, 따라서 산소 부족으로 인해 심장 근육에 돌이킬 수 없는 손상을 초래한다. 따라서, MI 치료의 1차 목표는 재판류 요법을 통해 심장 근육 손상을 감소시키는 것을 목표로 정상적인 관상동맥 혈류의 회복을 촉진하는 것이다. 재판류 요법은 일반적으로 경피적 관상동맥 중재술(PCI)과 같은 외과적 및 비 외과적 기법과 조합한, 혈류량을 증가시키고 혈전증을 감소시키는 치료제, 예컨대, 혈전 용해 요법의 이용을 수반한다. 조기 재판류 및 PCI가 바람직하고, 개선된 결과와 관련이 있으며, 가이드라인에서는 MI 증상 발생 후 12시간 이내에 PCI를 수행해야 한다고 제안한다(Ibanez et al. 2018).

[0003]

뇌혈관 질환은 뇌로의 혈액 순환에 영향을 미치는 병태를 지칭하며, 급성 허혈 뇌졸중(AIS) 및 일파성 허혈 발작(TIA)을 포함한다. 뇌혈관 질환은 전 세계적으로 사망과 심각한 장기 장애의 주요 원인이다(Roth et al. 2018 and Kyu et al. 2018). MI와 마찬가지로, 1차 목표는 재판류 요법을 통해 대뇌 조직 손상을 감소시키는 것을 목표로 정상적인 대뇌 혈류의 회복을 촉진하는 것이다. 재판류 요법은 혈전제거술과 같은 중재 기법과 조합한, 혈류량을 증가시키고 혈전증을 감소시키는 치료제, 예컨대, 혈전 용해 요법의 이용을 수반한다. 조기 재판류가 바람직하고, 개선된 결과와 관련이 있으며, 가이드라인에서는 적합한 환자에서, 혈전 용해성 재판류는 증상 발생 후 4,5시간 이내에, 혈전제거술은 6시간 이내에 수행할 것을 권장한다(Powers et al. 2018).

[0004]

2차 혈전 사건을 예방하고자 혈전 형성을 다루는 여러 치료 전략을 이용할 수 있는데, 이는 단백질 기반 치료제와 소분자 치료제의 두 부류로 나뉜다. 소분자 치료제의 예는 혈소판을 억제하고 혈전을 예방하는 능력으로 알려진 클로피도그렐, 티카그렐러, 프라수그렐 및 칸그렐러와 같은 P2Y₁₂ 수용체 억제제를 포함한다. 2차 예방에서 심혈관 이환율과 사망률을 감소시키는 데 있어서 클로피도그렐과 티카그렐러의 효과는 임상 시험에서 증명되었으며, 두 약물 모두 혈전 사건 예방용으로 승인되었다. 예를 들어, 영국의 NICE(National Institute for Health and Care Excellence)는 급성 관상동맥 증후군(ACS)을 앓는 성인을 위한 치료법으로 최대 12개월 동안 저용량의 아스피린과 함께 티카그렐러를 권장한다. 그러나 이러한 P2Y₁₂ 수용체 억제제에는 출혈 위험의 증가가 따르므로, 환자가 처방 정보 및 현재의 가이드라인에 따라 이 치료를 받도록 주의를 기울여야 한다. 비 심장색 전성 AIS 또는 TIA 이후, 후속 뇌졸중의 위험을 줄이기 위한 현재의 치료 가이드라인에서 최고 수준의 증거를 가진 항혈소판제는 아스피린이지만, 클로피도그렐도 사용된다. 최근 미국(Power et al 2018)과 중국(Wang et al 2017)의 가이드라인에서 AIS 또는 TIA의 24시간 이내에 아스피린과 클로피도그렐의 조합이 권장되며, 티카그렐러와 아스피린도 아스피린 단독보다 이점을 보였다(Johnston et al 2020).

[0005]

최근의 연구에서는 단백질 기반의 치료제로서 재조합 아피라제의 사용을 연구하였다. 아피라제(엑토-ATP 디포스 포하이드롤라제)는 ATP의 ADP로의 대사 및 ADP의 AMP로의 대사를 촉매하는 효소군을 구성한다. 체내에서, ATP 및 ADP의 아피라제 유도성 가수분해에 의해 생성된 AMP는 편재적으로 발현되는 세포 외 CD73/엑토-5'-뉴클레오티다제에 의해 아데노신으로 전환된다. 최초로 알려진 인간 아피라제인 CD39는 본래 활성화된 림프구 및 내피세포 상의 세포 표면 단백질로 동정되었고, 다양한 시험관 내 및 생체 내 연구는 아피라제가 혈관의 온전함을 유지하고 염증 및 혈전증을 생리적으로 억제할 수 있음을 보여주었다(Robson et al. 2005).

[0006]

아피라제는 ATP와 ADP의 수준을 감소시켜 3종의 혈소판 P2 수용체(P2X₁, P2Y₁ 및 P2Y₁₂) 모두와 ATP 및 ADP 상호 작용을 감소시켜, 혈소판 활성화 및 동원을 억제하는 작용을 한다. P2Y₁₂ 수용체의 소분자 억제제와는 달리, ADP 및 ATP 수준을 고갈시키기 위한 아피라제의 사용은 전임상 모델에서 출혈의 수준을 증가시키지 않는다. 항혈소판 효과 외에도, 아피라제는 또한 심장보호 효과와 뇌 조직 보호 효과가 있으며, 이는 i) 전염증성 ATP 및 ADP 분자의 고갈; 및 ii) 하류의 아피라제 작용을 통해 생성된 항염증성 아데노신의 증가된 수준을 통해 매개되는 것으로 이해된다. 내인성 아피라제의 작용 기전에 대한 더 많은 정보는 문헌[Moeckel et al. (2014)]의 도 1에 제공된다.

[0007]

문헌[Moeckel et al. (2014)]에서는 인간 CD39 패밀리의 구성원인 가용성 CD39L3의 재조합 최적화 형태의 설계 및 제조를 보고한다. 생성된 재조합 단백질은 'APT102' 또는 'AZD3366'으로 지칭된다. 저자들은 이 재조합 단백

질이 천연 아피라제보다 4배 더 높은 아데노신 디포스파타제 활성과 50배 더 긴 혈장 반감기를 나타냈으며, 동물 모델에서 APT102로 처리하였을 때 출혈 시간의 증가 없이 경색 크기가 감소했다고 보고하였다. 클로피도그렐 단독으로의 상응하는 치료는 이 모델에서 심장보호 효과를 나타내지 않았고, 한편, APT102와 클로피도그렐 치료의 조합은 APT102 단독에 의해 관찰되는 보호 효능을 바꾸지 않았다(문헌[Moeckel et al. (2014)]의 도 6). 문헌[Tan et al (2014)]에서는 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA)와 APT102의 조합이 tPA 또는 APT102 단독과 비교하여 사망률과 경색 부피를 감소시켰음을 보고하였다. 데이터는 또한 APT102가 출혈성 변형의 증가 없이 tPA 매개성 재판류에 대한 치료 창을 안전하게 확대할 수 있음을 시사한다.

[0008] 티카그렐러와 같은 P2Y₁₂ 수용체 억제제를 수반하는 최적의 항혈소판 및 항혈전 치료에도 불구하고, 여전히 약 10%의 연간 신규 심근경색 사건 위험이 존재하며, 이러한 치료의 강도를 증가시킬 경우 효능의 개선 없이 출혈 위험이 증가한다(Wallentin et al., 2009; Jernberg et al., 2015). 클로피도그렐 또는 티카그렐러 및 아스피린을 이용한 이중 항혈소판 요법의 이점을 탐색하는 AIS/TIA 환자에서의 최근 연구는 급성 환경(사건 후 1 내지 3개월)에서 새로운 허혈성 뇌졸중 사건의 위험이 5 내지 8% 남아 있음을 보여준다(Wang et al 2013, Johnston et al 2018, 2020).

[0009] 따라서, 심근 경색 및 급성 허혈성 뇌졸중(AIS)과 같은 허혈 사건의 치료에 사용될 수 있는 효과적이고 안전한 치료법 및 재발하는 허혈 사건을 예방할 수 있는 안전한 치료법은 여전히 필요하다. 본 발명은 위의 고려사항을 감안하여 고안되었다.

발명의 내용

[0010] 본 발명자들은 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질의 투여가 P2Y₁₂ 억제제 단독의 개별 사용에 비해 개선된 심장보호 이점을 제공함을 확인하였다. 이는 조합 치료가 심근 경색(예를 들어, ST 상승 심근 경색)과 같은 심장의 허혈 사건 및 급성 허혈성 뇌졸중과 같은 뇌의 허혈 사건의 효과적인 치료법으로 사용될 수 있음, 그리고 예를 들어, 허혈 사건(예를 들어, 심근 경색의 결과로 형성된 심장 손상, 또는 급성 허혈성 뇌졸중의 결과로 형성된 뇌 손상)으로 인한 손상을 예방 또는 개선하고 재발성 허혈 사건을 예방하는 데 사용될 수 있음을 시사한다.

[0011] 특히, 본 발명자들은 P2Y₁₂ 억제제(예를 들어 티카그렐러)와 함께 재조합 아피라제 단백질(예를 들어 AZD3366)의 투여가 놀랍게도 심근 경색(MI)의 동물 모델에서 경색 규모를 감소시키고 심장 기능을 개선하는 데 효과적임을 증명하였다. 이는 문헌[Moeckel et al. (2014)]의 도 6에 보고된 결과에도 불구하고 그러한데, 위 문헌에 따르면, P2Y₁₂ 억제제의 사용은 AZD3366 단독으로 관찰된 심장보호 효과에 영향을 미치지 않는다고 한다.

[0012] 나아가, 이론에 구애됨을 바라지 않고, 조합 치료에 의해 제공된 개선된 심장보호 효과는 적어도 증가된 수준의 세포 외 아데노신을 초래하는 P2Y₁₂ 억제제에 의해 유발된 것이라 여겨진다. AZD3366의 심장보호 효과는 또한 증가하는 수준의 세포 외 아데노신을 수반하는 것으로 보고되므로, 동일한 경로에 작용하며 동일한 최종 생성물의 수준을 조절하는 두 가지 작용제(P2Y₁₂ 억제제 및 재조합 아피라제 단백질)의 조합 사용이 단일 작용제 단독의 사용을 통해 관찰되는 것보다 더 큰 심장보호 효과를 유도하리라는 점은 예상하지 못했다.

[0013] 또한, 티카그렐러와 조합한 AZD3366의 투여는 티카그렐러 단독에 비해 동물 모델에서 출혈 수준을 유의미하게 증가시키지 않았음이 확인되었다. 이는 예를 들어, P2Y₁₂ 억제제가 이미 승인된 병태를 치료하기 위한, P2Y₁₂ 억제제 단독 사용에 비해, 조합 치료를 사용하는 데 있어서 출혈 증가의 측면에서 유의미한 추가 위험이 없으리라는 점을 시사하므로, 이 점은 중요하다.

[0014] 이러한 결과들은 동일하거나 상보적인 경로에서 항혈소판 활성의 증가 또는 항혈전 활성의 증가가 임의의 유익한 효능 효과와 함께 출혈 위험을 증가시킴이 일관되게 관찰되었던 임상 시험에서의 이전의 관찰과는 대조된다.

[0015] 따라서, 제안된 조합은 MI와 같은 환경에서 동일한 생물학적 경로에 기인하는 효과를 표적으로 하고 이를 증진 시켜 임상적 순이익이 개선될 수 있는 뜻밖의 제1 예이다.

[0016] 따라서, 본 개시의 일 양태는 환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 또 다른 양태에서 본 개시는 환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법에 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질을 제공하며, 방법은 환자에게 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함하고, 재조합 아피라제 단백질은

P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여된다.

- [0018] 추가의 양태에서, 본 개시는 환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법에 사용하기 위한 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제를 제공하며, 방법은 환자에게 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 본 개시는 환자에서 허혈 사건을 치료하는 방법에 사용하기 위한 P2Y₁₂ 억제제를 제공하며, 방법은 환자에게 P2Y₁₂ 억제제를 투여하는 단계를 포함하며, P2Y₁₂ 억제제는 재조합 아피라제 단백질과 함께 투여된다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 본 개시는 환자의 허혈 사건의 치료용 의약의 제조에 있어서 재조합 아피라제 단백질 및/또는 P2Y₁₂ 억제제의 용도를 제공하며, 치료는 환자에게 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0021] P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러, 클로피도그렐, 티클로피딘, 프라수그렐, 및 칸그렐러로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러, 클로피도그렐 및 프라수그렐로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러 또는 클로피도그렐이다. 훨씬 더 바람직하게는, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러이다.
- [0022] 재조합 아피라제 단백질은 재조합 인간 CD39L3 아피라제, 선택적으로 가용성 재조합 인간 CD39L3 아피라제일 수 있다. 아피라제는 가용성 CD39L3 또는 US7247300B1, EP2133430B1 및 EP2523971B1 중 임의의 하나에 기술된 바와 같은 ADP아제 증진된 아피라제일 수 있다. 예시적인 재조합 인간 CD39L3 아피라제는 본원에 서열번호 2로서 제공된다.
- [0023] 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 1의 위치 49 내지 485와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가용성 CD39L3 단백질이며, 이때, 재조합 아피라제 단백질은 ADP아제 및 ATP아제 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 기준 아피라제와 비교하여 1개 이상의 변형(예를 들어, 아미노산 치환)을 포함하며, 상기 기준 아피라제는 야생형 아피라제(예를 들어, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 아피라제) 또는 가용성 아피라제(예를 들어, 서열번호 1의 위치 49 내지 485에 기재된 아미노산 서열을 갖는 가용성 아피라제)일 수 있다.
- [0024] 이러한 변형(들)은 기준 아피라제와 비교하여 증가된 ADP아제 활성 또는 기준 아피라제와 비교하여 감소된 ATP 아제 활성과 조합된 기준 아피라제와 동일한 ADP아제 활성을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 위치 67 및 69에서의 치환을 포함하거나 이로 구성될 수 있는데, 이때, 위치는 서열번호 1에 따라 넘버링된다. 위치 67에서의 치환은 글리신으로의 치환일 수 있고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환일 수 있고, 또는 위치 67에서의 치환은 알라닌으로의 치환일 수 있고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환일 수 있다. 바람직하게는, 위치 67에서의 치환은 글리신으로의 치환이고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환이다.
- [0025] 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열(AZD3366)과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정한 예시적인 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0026] 일부 경우, 환자는 허혈 사건이 발생할 때 이미 P2Y₁₂ 억제제를 이용한 치료를 받고 있을 수 있다. 예를 들어, 급성 관상동맥 증후군(ACS)을 치료하는 데 있어서 티카그렐러의 처방 정보는 180 mg의 "로딩" 용량으로 치료를 개시한 다음, ACS 사건 후 첫 해 동안 90 mg의 "유지" 용량을 1일 2회 투여하고, 1년 후, 60 mg을 1일 2회 투여하는 것을 기술한다. 따라서, 환자는 지난 2년 내에 이전의 허혈 사건을 사전에 경험했을 수 있고, 여기서 치료되는 허혈 사건이 발생할 때, 예를 들어, 티카그렐러를 1일 2회 복용함으로써, P2Y₁₂ 억제제를 이용한 만성 치료를 현재 받고 있는 중이다. 위에서 언급한 바와 같이, 최적의 항혈소판 및 항혈전 치료에도 불구하고, 새로운 허혈 사건이 발생할 위험은 여전히 남아 있다.
- [0027] 예를 들어, 환자는 현재의 방법이 수행되기 전에 앞선 72시간, 또는 앞선 36시간, 또는 앞선 48시간, 또는 앞선 24시간, 또는 앞선 20시간, 또는 앞선 16시간, 또는 앞선 12시간, 또는 앞선 8시간, 또는 앞선 6시간 내에

P2Y₁₂ 억제제를 받았을(투여 받았을) 수 있다. 예를 들어 P2Y₁₂ 억제제가 티카그렐러인 일부 구현예에서, 환자는 앞선 8 내지 16시간, 예를 들어, 12시간 내에 P2Y₁₂ 억제제를 받은 적이 있다(즉, 1일 2회 투여된 유지 용량의 일부로서).

[0028] 다른 경우, 환자는 P2Y₁₂ 억제제를 이용한 치료를 현재 받고 있지 않을 수 있다. 이러한 환자를 "미경험" 환자라 기술한다. 이는 환자가 P2Y₁₂ 억제제를 투여받은 적이 없는 경우와 환자가 이전에 P2Y₁₂ 억제제를 투여받은 적이 있으나, 본 방법이 수행되기 전에 적어도 24시간, 48시간, 72시간 또는 1주일 동안 투여가 일어나지 않은 경우를 포함한다.

[0029] 바람직한 구현예에서, 방법은 재조합 아피라제 단백질 외에도 P2Y₁₂ 억제제를 환자(예를 들어, P2Y₁₂ 억제제를 이용한 치료 또는 또 다른 P2Y₁₂ 억제제를 이용한 치료를 받고 있는 환자, 또는 미경험 환자)에게 투여하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 방법은 개별적으로, 예를 들어, 동시에 또는 순차적으로 투여되는 개별 제형으로서 P2Y₁₂ 억제제와 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함한다. 숙련된 의사 또는 다른 숙련된 의료진은 환자에게 각각의 치료제를 투여하는 가장 적합한 방식을 결정할 수 있다.

[0030] 순차적인 투여가 사용되는 경우, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제는 서로 바람직하게는 24시간, 12시간, 1시간 이내에, 또는 더욱 바람직하게는 30분 이내에 투여된다. 일부 구현예에서 재조합 아피라제 단백질이 먼저 투여된 후, P2Y₁₂ 억제제가 순차적으로 투여된다. 다른 구현예에서 P2Y₁₂ 억제제가 먼저 투여된 후, 재조합 아피라제 단백질이 순차적으로 투여된다.

[0031] 일부 구현예에서, 치료되는 혀혈 사건은 급성 관상동맥 증후군이다. 급성 관상동맥 증후군은 ST 세그먼트 상승 심근 경색(STEMI), 비 ST 세그먼트 상승 심근 경색(NSTEMI) 및 불안정 협심증을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 치료되는 혀혈 사건은 환자의 ST 세그먼트 상승 심근 경색(STEMI)이다.

[0032] 본원에서 증명된 바와 같이, 재조합 아피라제 단백질(예를 들어 AZD3366) 및 P2Y₁₂ 억제제(예를 들어 티카그렐러)의 조합 투여는 심근 경색의 전임상 동물 모델에서 심장보호 효과를 가져왔는데, 위약 및 P2Y₁₂ 억제제 단독을 이용한 치료와 비교하여 경색 크기를 감소시키고 심장 기능을 개선하였다. 위에 기재한 바와 같이, 심근 경색 후의 조기 재관류가 바람직하고, 개선된 결과와 관련이 있다. 따라서, 관상동맥 증후군(예를 들어 STEMI)을 앓는 환자에서 P2Y₁₂ 억제제와 함께 아피라제 단백질을 투여하는 단계는 바람직하게는 급성 관상동맥 증후군의 발병 후 가능한 한 곧 수행되며, 바람직하게는 환자가 경피적 관상동맥 중재술(PCI)을 받는 시간과 가능한 한 가깝게, 예컨대, 환자가 경피적 관상동맥 중재술(PCI)을 받는 시간 전에 수행된다.

[0033] 다른 구현예에서, 치료되는 혀혈 사건은 급성 혀혈성 뇌졸중이다. 매년, 70,000명의 인구에서 100명의 새로운 환자가 혀혈성 뇌졸중을 앓는다. 치료를 받지 않으면, 1년 이내에 55명의 환자가 사망하거나 의존하게 된다. 100명의 환자 중 대부분은 중등도 또는 일과성 뇌졸중을 앓고, 재발을 감소시키기 위하여 항혈소판 약물만 받는다. 약 25 내지 35명의 환자가 재관류 요법을 받으며, 이는 사망 또는 의존으로부터 5 또는 6명의 환자를 구하고, 장애가 없는 이의 수를 증가시킨다. 따라서, 급성 혀혈성 뇌졸중(AIS)과 관련된 이환율과 사망률을 감소시키는 것은 충족되지 않은 임상적 요구이다.

[0034] 전임상 및 임상 시험은 혀혈성 뇌졸중 사건 후의 뇌졸중을 치료 및/또는 예방하기 위하여 P2Y₁₂ 억제제 및 아스피린의 사용을 평가하였다. 나아가, 전임상 데이터는 재조합 아피라제 단백질 AZD3366이 혀혈성 뇌졸중의 동물 모델에서 재관류를 증진시키고, 재폐색을 감소시키고, 뇌내 출혈을 감소시키는 데 사용될 수 있음을 증명하였다 (Sun et al., 2011; Tan et al., 2014). 따라서, AZD3366 및 P2Y₁₂ 억제제의 조합 투여와 관련된, 본원에 기술된 전임상 심근 경색 동물 모델에서의 유익한 결과가 혀혈성 뇌졸중의 치료에서도 유익할 수 있음이 인식되었다. 예를 들어, 조합 치료는 혀혈성 뇌졸중을 앓는 환자에서 경색 크기를 감소시키고/시키거나 뇌 손상을 감소시킬 수 있고, 재발성 혀혈 사건을 예방하는 것 외에도 P2Y₁₂ 억제제 단독과 비교하여 유의미하게 증가된 출혈 위험 없이 이 효과를 달성할 수 있다.

[0035] 아래에 더욱 상세히 기술된 바와 같이, 경우 P2Y₁₂ 억제제의 작용 개시에 소요되는 시간은 일반적으로 수 시간으로, 혀혈 사건(예를 들어 급성 관상동맥 증후군)의 개시 후 P2Y₁₂ 억제제가 매우 조기에 투여되더라도, 환자가 관련된 손상(예를 들어, 심근 경색의 결과로서 형성된 심장 손상) 또는 재발성 혀혈 사건의 위험으로부터 보호

되지 않는 수 시간의 기간이 존재함을 의미한다. 대조적으로, 재조합 아피라제 단백질 AZD3366은 전임상 모델에서 정맥 내 투여의 수 분 이내에 높은 수준의 활성을 갖고 용량에 따라 24시간을 초과하여 이 활성을 유지하는 것으로 나타났다(Moekel et al. 2015). 따라서, 조기에 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 것은, 주로 항혈전 효과를 발휘하기 위하여 충분한 수준의 P2Y₁₂ 억제제가 환자의 혈류에서 생체이용 가능하게 되기 전에 심근 경색 또는 AIS의 초기 단계 중에 항혈전 및 조직 보호 효과를 제공하리라는 점이 인식되었다.

[0036] 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 허혈 사건(예를 들어, 급성 관상동맥 증후군, 예컨대 STEMI, 또는 급성 뇌혈관 사건, 예컨대, AIS 또는 TIA)의 개시 후 24시간 이하, 또는 18시간 이하, 또는 12시간 이하, 또는 6시간 이하, 또는 4시간 이하, 또는 2시간 이하, 또는 1시간 이하, 또는 심지어 30분 이하 후에 P2Y₁₂와 함께 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서 방법은 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여한 후 48시간 미만, 24시간 미만, 12시간 미만, 6시간 미만, 3시간 미만, 2시간 미만, 또는 1시간 미만 후에 환자에 대해 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법)을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 허혈 사건은 심근 경색(예를 들어, STEMI)이고, 재관류 요법은 PCI이다. 특정 구현예에서, 허혈 사건은 AIS이고, 재관류 요법은 혈전제거술이다. 특정 구현예에서, 허혈 사건은 심근 경색(예를 들어, STEMI) 또는 AIS이고, 재관류 요법은 혈전 용해 요법(예를 들어, 조직 플라스미노겐 활성화 인자)이다. 특정 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제는 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법) 중에 환자의 혈류에서 생체이용 가능하게 남아 있다.

[0037] 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 10 내지 1000 mg의 용량으로 투여된다.

[0038] 일부 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러이고, 60 내지 200 mg의 용량, 예를 들어, 60 mg, 90 mg, 120 mg 또는 180 mg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 티카그렐러는 180 mg의 권장된 로딩 용량으로 투여된다.

[0039] 일부 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 클로피도그렐이고, 75 내지 600 mg의 용량, 예를 들어, 75 mg, 150 mg, 225 mg, 300 mg, 375 mg, 450 mg, 525 mg 또는 600 mg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 클로피도그렐은 300 mg 또는 600 mg의 권장된 로딩 용량으로 투여된다.

[0040] 일부 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 티클로피딘이고, 250 내지 500 mg의 용량, 예를 들어, 250 mg 또는 500 mg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 티클로피딘은 500 mg의 권장된 로딩 용량으로 투여된다.

[0041] 일부 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 프라수그렐이고, 5 내지 60 mg의 용량, 예를 들어, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 또는 60 mg으로 투여된다. 일부 구현예에서, 프라수그렐은 60 mg의 권장된 로딩 용량으로 투여된다.

[0042] 일부 구현예에서 P2Y₁₂ 억제제는 칸그렐러이고, 정맥 내 블루스 kg당 30 μg의 용량으로 투여된 후, 정맥 내 주입 분당 4 μg/kg으로 투여된다.

[0043] 일부 구현예에서, 방법은 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질이 P2Y₁₂ 억제제 및 아스피린과 함께 투여되도록 환자에게 아스피린을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 이를 구현예에서, 방법은 일반적으로 개별적으로, 예를 들어, 동시에 또는 순차적으로 투여되는 개별 제형으로서, 재조합 아피라제 단백질, P2Y₁₂ 억제제 및 아스피린을 투여하는 단계를 포함한다. 아스피린은 50 내지 325 mg의 용량으로 투여될 수 있다.

[0044] 일부 구현예에서, 방법은 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질이 P2Y₁₂ 억제제 및 혈전 용해 요법과 함께 투여되도록 환자에게 혈전 용해 요법(예를 들어, tPA)을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 이를 구현예에서, 방법은 일반적으로 개별적으로, 예를 들어, 동시에 또는 순차적으로 투여되는 개별 제형으로서, 재조합 아피라제 단백질, P2Y₁₂ 억제제 및 혈전 용해 요법을 투여하는 단계를 포함한다.

[0045] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기술된 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제를 포함하는 키트에 관한 것으로, 선택적으로 키트는 아스피린을 추가로 포함한다.

[0046] 본 발명은 기술된 양태 및 바람직한 특징의 조합을 포함하되, 이러한 조합이 명백하게 허용할 수 없거나 명확히 회피되는 경우는 제외한다.

도면의 간단한 설명

[0047]

이하, 본 발명의 원리를 예시하는 구현예 및 실험을 첨부된 도면을 참조하여 논의하기로 한다.

도 1은 심근 경색의 돼지 동물 모델에서 감소된 경색 크기 및 개선된 심장 기능의 측면에서 재조합 아피라제 단백질 AZD3366이 티카그렐러 단독의 이익에 추가의 이익을 부여하는지를 조사하는 데 사용되는 실험 프로토콜을 예시한다. BSL = 기준선; MI = 심근 경색; Sac = 희생.

도 2는 티카그렐러(T), 1 mg/kg의 AZD3366(AZD1), 3 mg/kg의 AZD3366(AZD3)의 투여 및 AZD3366 및 티카그렐러의 조합 투여(T+AZD1) 후에 측정한 혈액 손실량을 보여주는 마우스 꼬리 출혈 실험으로부터 얻은 결과를 보여준다. 결과는 AZD3366 및 티카그렐러의 조합 투여가 티카그렐러 단독(T)에 대해 관찰된 것 이상으로 혈액 손실을 증가시키지 않았음을 증명한다. 평균±SEM을 제시하였다. ns; 유의미하지 않음, ***; P<0.001 (일원 분산분석 +Dunnett의 다중 비교 검정).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

이하, 본 발명의 양태 및 구현예를 첨부된 도면을 참조하여 논의하기로 한다. 추가의 양태 및 구현예는 당업자에게 명백할 것이다. 본문에 언급된 모든 문헌은 본원에 참조로 포함된다.

[0050]

재조합 아피라제 단백질

[0051]

아피라제(EC 3.6.1.5)는 아데노신 삼인산(ATP)의 아데노신 일인산(AMP)으로의 인산무수 결합의 가수분해 및 아데노신 이인산(ADP)의 AMP로의 인산무수 결합의 가수분해를 촉매한다. CD39 패밀리 구성원(엑토-뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제(E-NTPD아제) 패밀리 구성원이라고도 지칭함)은 일부 가장 잘 특성화된 아피라제를 대표한다. 인간 CD39 패밀리 구성원은 다음 표에 기재된 천연 단백질을 포함한다:

천연 단백질의 명칭	추가 명칭	NCBI 등록번호
CD39	ATPD 아제, 엑토-아피라제, NTPD 아제 1	U87967.1
CD39L1	NTPD 아제 2, 엑토-ATP 아제	AF144748.1
CD39L2	NTPD 아제 6	AY327581.1
CD39L3	NTPD 아제 3, CD39L3, HB6	AF034840.2
CD39L4	NTPD 아제 5, ER-UDP 아제, PCPH	AF039918.1
LALP70	UDP 아제, NTPD 아제 4	AF016032.1
LALP1	NTPD 아제 7	AF269255.1
간 소관 엑토-ATP 아제	NTPD 아제 8, hATPD 아제	AY430414.1

[0052]

일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 재조합 인간 아피라제 단백질 또는 이의 조작된 버전이다. 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 재조합 인간 아피라제 단백질의 단편 또는 이의 조작된 버전이다. 일반적으로, 본 발명의 재조합 인간 아피라제 단백질 또는 이의 조작된 버전과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "단편"은 전장 단백질의 효소 활성(예를 들어, ADP아제 및 ATP아제 활성)을 보유하는 N 말단 및/또는 C 말단의 단축된 단백질에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 CD39 패밀리의 구성원, 예를 들어, 위의 표에 기재된 임의의 천연 단백질 또는 이의 조작된 버전이다.

[0054]

재조합 아피라제 단백질은 가용성 재조합 인간 아피라제 단백질, 예를 들어 CD39 패밀리의 구성원일 수 있는 아피라제 단백질의 막관통 도메인을 구성하는 아미노산 잔기의 일부 또는 전부가 결여된 아피라제 단백질일 수 있다. 예를 들어, 인간 CD39L3은 서열번호 1에 제시된 529 아미노산 잔기 단백질이고, 특정한 예시적인 가용성 CD39L3 아피라제 단백질은 서열번호 1의 위치 49 내지 485로 제시된 아미노산 서열을 갖는다.

[0055]

재조합 아피라제 단백질과 관련하여 용어 "조작된" 또는 "이의 조작된 버전"은 조작된 단백질이 기준 아피라제

단백질과 유사하지만 동일하지는 않은 아미노산 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 서열 동일성은 일반적으로 알고리즘 GAP(Wisconsin GCG 패키지, Accelrys Inc, 미국 샌디에고 소재)을 참조하여 정의된다. GAP은 Needleman 및 Wunsch 알고리즘을 사용하여 두 개의 완전한 시퀀스를 정렬하여 매치의 수를 최대화하고 갭의 수를 최소화한다. GAP의 사용이 바람직할 수 있지만, 일반적으로 디폴트 파라미터를 이용하는 다른 알고리즘, 예를 들어, BLAST(문헌[Altschul et al. (1990)]의 방법을 이용함), FASTA(문헌[Pearson and Lipman (1988)]의 방법을 이용함), 또는 Smith-Waterman 알고리즘(문헌[Smith and Waterman (1981)]), 또는 문헌[Altschul et al. (1990), 위 참조]의 TBLASTN 프로그램이 사용될 수 있다. 특히, psi-Blast 알고리즘이 사용될 수 있다.

[0056]

기준 아피라제 단백질은 야생형 아피라제 단백질(예를 들어, 전장 CD39L3 아피라제 단백질) 또는 가용성 아피라제 단백질(예를 들어, 서열번호 1의 위치 49 내지 485로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질)일 수 있다. 조작된 재조합 아피라제 단백질은 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, 기준 아피라제와 비교하여 효소 활성(예를 들어, ADP아제 활성)을 변경하는 치환 및/또는 기준 아피라제의 효소 활성을 실질적으로 변경하지 않는 기능 보존적 치환을 포함할 수 있다. 조작된 재조합 아피라제 단백질은 예를 들어, 단백질의 N 또는 C 말단에 기준 아피라제의 효소 활성(예컨대, ADP아제 및 ATP아제 활성)을 실질적으로 변경하지 않는 하나 이상의 아미노산 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 조작된 재조합 아피라제 단백질은 기준 아피라제 단백질과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 서열번호 2에 기재된 재조합 아피라제 단백질(AZD3366)은 서열 번호 1의 위치 49 내지 485로 기재된 아미노산 서열을 갖는 가용성 CD39L3 아피라제 단백질의 조작된 버전이다.

[0057]

바람직한 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 CD39L3 단백질 또는 이의 조작된 버전이다. 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 1과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 훨씬 더 바람직한 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 가용성 CD39L3 단백질 또는 이의 조작된 버전이다. 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 1의 위치 49 내지 485로 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0058]

CD39L3의 조작된 버전(예를 들어, 증진된 아피라제)을 포함한 가용성 재조합 아피라제 단백질의 설계, 제조 및 용도는 US7247300B1, EP2133430B1 및 EP2523971B1에 기술되어 있으며, 이를 모두는 전체가 참조로서 본원에 포함된다. 본원에 기술된 재조합 아피라제 단백질은 이러한 간행물에 기술된 아피라제 중 임의의 것일 수 있다.

[0059]

EP2133430B1은 ADP아제가 증진된 아피라제를 기술하고 있다. 이러한 ADP아제가 증진된 아피라제는 기준 아피라제의 변형된 형태를 포함하며, 변형은 기준 아피라제와 비교하여 증가된 ADP아제 활성 또는 기준 아피라제와 비교하여 감소된 ATP아제 활성과 조합된 기준 아피라제와 동일한 ADP아제 활성을 초래한다. 예시적인 ADP아제가 증진된 아피라제는 CD39L3의 위치 67 및 69에서 치환을 포함하는 것들을 포함하며, 이때, 위치 넘버링은 서열번호 1에 따른다. 구체적으로, ADP아제가 증진된 아피라제는 R67G 및 T69R 치환을 포함하는 단백질 8743 및 R67A 및 T69R 치환을 포함하는 단백질 8906을 포함한다.

[0060]

이 활성을 결정하는 데 사용되는 예시적인 ATP아제 및 ADP아제 분석법은 EP2133430B1에 개시되어 있다. 예를 들어, 정제된 가용성의 ADP아제가 증진된 아피라제의 ATP아제 및 ADP아제 효소 활성은 8 mM의 CaCl₂, 200 μM의 기질(ATP아제의 경우 ATP 또는 ADP아제의 경우 ADP), 50 mM의 이미다졸, 및 50 mM의 Tris, pH 7.5를 함유하는 1 mL의 용액에서 37°C에서 결정할 수 있다(Picher, et al., Biochem. Pharmacol. (1938) 51 :1453). 0.25 mL의 말라카이트 그린 시약을 첨가하여 반응을 중단시키고 방출된 무기 인산염을 측정할 수 있다(Baykov, et al., Anal. Biochem. (1988) 171 :266). 630 nm에서의 분광학적 분석에 기초하여, 1단위의 ATP아제(또는 ADP아제)는 37°C에서 분당 1 μmole의 무기 인산염의 방출에 해당한다. Km 및 kcat과 같은 효소에 대한 주요 동역학 상수는 예를 들어, Michaelis-Menten 식에 데이터를 적합화시켜 수득할 수 있다. 생화학적 기능을 모니터링하는 데 유용한 기타 분석법은 문헌[Gayle Ill, et al. (J. Clin Invest. (1998) 101:1851-1859)]에 기술된 방사측정 분석법, HPLC 분석법, 또는 문헌[Marcus, A.J., et al. (J. Clin Invest. (1991) 88:1690-1696)]에 기술된 방사성-TLC 분석법을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0061]

따라서, 본원에 기술된 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 1의 위치 49 내지 485로 기재된 아미노산 서열을 갖는 기준 아피라제(즉, CD39L3의 가용성 버전)와 비교하여 하나 이상의 변형(예를 들어, 아미노산 치환)을 포함할 수 있다. 이러한 변형(들)은 기준 아피라제와 비교하여 증가된 ADP아제 활성 또는 기준 아피라제와 비교하여 감소된 ATP아제 활성과 조합된 기준 아피라제와 동일한 ADP아제 활성을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 위치 67 및 69에서의 치환을 포함하거나 이로 구성될 수 있는데, 이때, 위치는 서열번호 1에 따

라 넘버링된다. 위치 67에서의 치환은 글리신으로의 치환일 수 있고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환일 수 있고, 또는 위치 67에서의 치환은 알라닌으로의 치환일 수 있고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환일 수 있다. 바람직하게는, 위치 67에서의 치환은 글리신으로의 치환이고, 위치 69에서의 치환은 아르기닌으로의 치환이다.

[0062] EP2523971B1은 예를 들어, 아피라제 분자의 80% 초과분이 EVLP를 포함하는 동일한 N 말단을 갖도록, 균질한 N 말단을 포함하는 아피라제 및 이러한 아피라제의 제조 방법을 기술하고 있다. 균질한 N 말단을 갖는 이러한 단백질은 3.0 내지 4.5의 범위의 평균 등전점을 갖고/갖거나 토키 및 돼지에서 증진된 반감기를 갖는 것으로 기술되어 있다.

[0063] 따라서, 본원에 기술된 재조합 아피라제 단백질은 EP2523971B1에 기술된 바와 같이, 아피라제 분자의 80% 초과분이 동일한 N 말단을 갖고, 이러한 N 말단은 EVLP이도록, 균질한 N 말단을 포함할 수 있다.

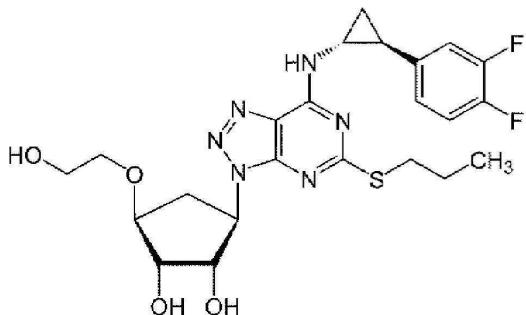
[0064] 특정 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 (예를 들어, 위에 기술된 ADP아제가 증진된 아피라제의 치환 이외에도) 하나 이상의 기능 보존적 치환을 추가로 포함할 수 있다. 기능 보존적 치환은 동등한 비치환 단백질과 비교하여 하나 이상의 기능적 특성(예를 들어, 효소 활성)에 영향을 미치지 않는(또는 실질적으로 영향을 미치지 않는) 치환이다. 일부 구현예에서 재조합 아피라제 단백질은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 기능 보존적 치환을 포함한다.

[0065] 바람직한 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 2와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 선택적으로 위치 67의 아미노산 잔기는 글리신이고 위치 69의 아미노산 잔기는 아르기닌이고, 이때, 위치는 서열번호 1에 따라 넘버링된다. 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질은 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개)의 기능 보존적 치환을 갖는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 선택적으로 위치 67의 아미노산 잔기는 글리신이고 위치 69의 아미노산 잔기는 아르기닌이고, 이때, 위치는 서열번호 1에 따라 넘버링된다. 예시적인 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0067] P2Y₁₂ 억제제

[0068] P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러, 클로피도그렐, 티클로피딘, 프라수그렐, 및 칸그렐러로 구성된 목록으로부터 선택될 수 있다. 본원에서 P2Y₁₂ 억제제에 대한 언급은 임의의 이러한 화합물뿐만 아니라, 임의의 대사산물, 예를 들어, 활성 대사산물을 포함한다. 일부 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러, 클로피도그렐, 티클로피딘 및 프라수그렐로 구성된 목록으로부터 선택될 수 있고, 예를 들어, 티카그렐러, 클로피도그렐 및 프라수그렐로 구성된 목록으로부터 선택될 수 있다. 바람직한 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러 또는 클로피도그렐일 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, P2Y₁₂ 억제제는 티카그렐러이다.

[0069] 티카그렐러[(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[[((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐) 시클로프로필]아미노]-5-(프로필티오)-3H-1,2,3-트리아졸로[4,5-d]페리미딘-3-일]-5-(2-하이드록시에톡시)-1,2-시클로펜坦디올]은 가역적으로 결합하는 경구 P2Y(12) 수용체 길항제이다. 또한, 티카그렐러는 균형 유지 뉴클레오시드 수송체-1(equilibrative nucleoside transporter-1, ENT-1)을 억제하여 국소 내인성 아데노신 수준을 증가시키며, 아데노신 유도성 반응을 증가시키는 것으로 기록되었다. 티카그렐러는 급성 관상동맥 증후군 및 이전의 심근 경색 환자에서 그리고 AIS 및 일과성 허혈 발작에 대한 규제 기록에서 혈전성 사건의 예방용으로 승인되었다. 티카그렐러는 다음의 화학 구조를 갖는다:



[0070]

[0071] 티카그렐러는 미국 및 유럽을 포함한 여러 관할 구역에서 사용 승인된 BRILINTA®(또는 유럽에서 BRILIQUET)로 알려진 의약품의 활성 성분이다. 티카그렐러는 현재 60 mg 및 90 mg의 즉시 방출 정제 형태로 시판되고 있다. WO 2008/024045는 경구 투여를 위한 티카그렐러를 함유하는 특정 제약 제형을 개시하고 있다. WO 2017/182589는 신속하게 분해되는 티카그렐러의 경구 투여 형태를 개시하고 있다.

[0072]

[0072] 티카그렐러는 일반적으로 경구 투여 후 신속하게 흡수된다. 클로피도그렐 및 프라수그렐과 달리, 티카그렐러는 전구약물이 아니고, 활성을 위한 대사 활성화를 요구하지 않는다. 그럼에도, 티카그렐러는 광범위하게 대사되고, 티카그렐러 및 이의 대략 P2Y₁₂와 효능이 동등한 대사산물(AR-C124910XX)은 혈장의 주요 순환 성분을 포함한다. 티카그렐러 및 이의 활성 대사산물의 혈장 농도는 용량 의존적인 방식으로 증가한다. 피크 농도는 각각 대략 1.5시간 및 2.5시간 이내에 달성된다. 혈소판 응집의 최대 억제는 투여 후 대략 2시간 후에 관찰되며, 이는 투여 후 8시간을 초과하여 유지된다. 티카그렐러 및 이의 활성 대사산물의 평균 제거 반감기는 각각 7시간과 9시간으로 약물 라벨에 기술되어 있다. 중단 후, 혈소판 활성은 5일 후에 기준선으로 되돌아간다.

[0073]

[0073] 바람직한 구현예에서, 티카그렐러는 재조합 아피라제 단백질과 함께 180 mg의 로딩 용량으로 경구 투여된다. 티카그렐러는 예를 들어, WO 2017/182589에 기술된 바와 같이 구강분해성 정제(ODT) 형태로 투여될 수 있다. 하나 이상의 후속 유지 용량은 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질 없이, 로딩 용량 후에 투여될 수 있다. 위에 기술된 바와 같이, 180 mg의 초기 로딩 용량 후, 티카그렐러에 대한 처방 정보는 ACS 사건 후 첫 해 동안 1일 2회 90 mg의 유지 용량을 투여하고, 1년 후에는 1일 2회 60 mg를 투여하는 것을 기술한다. 하나 이상의 후속 유지 용량은 90 mg의 티카그렐러의 1일 2회 용량 또는 60 mg의 티카그렐러의 1일 2회 용량을 포함할 수 있다. 처방 정보는 75 내지 100 mg의 아스피린의 1일 유지 용량과 함께 티카그렐러를 투여하는 것을 추가로 기술한다. 따라서, 하나 이상의 후속 유지 용량은 75 내지 100 mg의 아스피린의 1일 용량을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0074]

[0074] P2Y₁₂-수용체 억제제는 클로피도그렐일 수 있다. 클로피도그렐은 일반적으로 경구 경로를 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 클로피도그렐은 재조합 아피라제 단백질과 함께 300 mg 또는 600 mg의 로딩 용량으로 투여된다. 하나 이상의 후속 유지 용량은 약 75 mg의 클로피도그렐을 포함할 수 있고, 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질 없이, 로딩 용량 후에 투여될 수 있다. 위의 티카그렐러와 마찬가지로, 클로피도그렐의 유지 용량은 75 내지 100 mg의 아스피린의 1일 용량과 함께 투여될 수 있다.

[0075]

[0075] 클로피도그렐은 전구약물이며, 이의 활성을 위해 대사 활성화를 요구한다. 활성 대사산물의 피크 혈장 농도는 경구 투여 후 대략 30 내지 60분 후에 발생하며, 용량 의존적인 혈소판 응집 억제가 투여 후 약 2시간 내에 관찰되고, 피크 혈소판 억제가 약 8시간 후에 관찰된다. 단일 용량의 경구 투여 후, 용량 의존적인 혈소판 응집 억제가 2시간 내에 관찰될 수 있다. 클로피도그렐은 75 mg의 단일 용량 후 대략 6시간의 제거 반감기를 갖는 한편, 이의 활성 대사산물은 대략 30분의 제거 반감기를 갖는다. 중단 후, 혈소판 응집 및 출혈 시간은 약 5일 내에 점진적으로 기준선으로 되돌아간다.

[0076]

[0076] P2Y₁₂-수용체 억제제는 프라수그렐일 수 있다. 프라수그렐은 일반적으로 경구 경로를 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 프라수그렐은 재조합 아피라제 단백질과 함께 60 mg의 로딩 용량으로 투여된다. 하나 이상의 후속 유지 용량은 약 5 mg 또는 10 mg의 프라수그렐을 포함할 수 있고, 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질 없이, 로딩 용량 후에 투여될 수 있다. 위의 티카그렐러와 마찬가지로, 프라수그렐의 유지 용량은 75 내지 100 mg의 아스피린의 1일 용량과 함께 투여될 수 있다.

[0077]

[0077] 프라수그렐은 전구약물이며, 약리 활성 대사산물로 신속하게 대사된다. 활성 대사산물의 피크 혈장 농도는 투여 후 대략 30분 후에 발생하며, 피크 혈소판 억제는 약 2시간에 발생한다. 프라수그렐은 약 7.4시간의 제거 반감

기를 갖는다.

- [0078] P2Y₁₂-수용체 억제제는 티클로피딘일 수 있다. 티클로피딘은 일반적으로 경구 경로를 통해 투여된다. 일부 구현 예에서, 티클로피딘은 일반적으로 경구 경로를 통해 투여된다. 일부 구현 예에서, 티클로피딘은 재조합 아피라제 단백질과 함께 500 mg의 로딩 용량으로 투여된다. 하나 이상의 후속 유지 용량은 약 250 mg의 티클로피딘을 포함할 수 있고, 예를 들어, 재조합 아피라제 단백질 없이, 로딩 용량 후에 투여될 수 있다. 위의 티카그렐러와 마찬가지로, 티클로피딘의 유지 용량은 75 내지 100 mg의 아스피린의 1일 용량과 함께 투여될 수 있다.
- [0079] 티클로피딘의 피크 혈장 수준은 일반적으로 경구 투여 후 약 2시간 후에 관찰된다. 단일 용량 후의 반감기는 7 내지 13시간 범위이다. 반복 투여 후의 반감기는 약 4 내지 5일이다.
- [0080] P2Y₁₂-수용체 억제제는 칸그렐러일 수 있다. 칸그렐러는 볼루스로서, 연속 주입액으로, 또는 볼루스에 이은 연속 주입액으로서 정맥 내로 투여될 수 있다. 일부 구현 예에서, 칸그렐러는 정맥 내 볼루스 kg당 30 μg의 용량으로 투여된 직후, 정맥 내 주입 분당 4 μg/kg으로 투여된다.
- [0081] 칸그렐러는 신속하게 정상 상태 혈장 수준에 도달하고, 혈소판 응집 억제는 주입 개시 30분 이내에 이루어지며, 혈장 반감기는 짧아서 대략 9분 미만이다. 최대 혈소판 억제는 15분 이내에 달성된다. 칸그렐러의 제거 반감기는 약 3 내지 6분이고, 혈소판 반응은 일반적으로 중단 15분 이내에 기준선으로 되돌아간다.
- [0083] 치료 및 투여
- [0084] 본원에 기술된 방법 및 사용을 위한 생성물은 환자(예를 들어, 인간 환자)에서 허혈 사건을 치료하기 위한 것으로, 혈액 공급이 환자의 신체의 특정 부분, 예를 들어, 환자의 심장 또는 뇌로 제한되는 질환 및 장애를 포함하며, 제한은 혈전에 의해 초래될 수 있다. 심장에서의 허혈 사건은 급성 관상동맥 증후군을 포함한다. 뇌에서의 허혈 사건은 급성 뇌혈관 사건으로 지칭되고, 급성 허혈성 뇌졸중(AIS) 및 일과성 허혈 발작(TIA)을 포함한다. 급성 관상동맥 증후군은 ST 세그먼트 상승 심근 경색(STEMI) 또는 비 ST 세그먼트 상승 심근 경색(NSTEMI)으로 분류되는 심근 경색 및 불안정 협심증을 포함한다. 바람직한 구현 예에서, 치료는 환자의 ST 세그먼트 상승 심근 경색(STEMI)의 치료이다.
- [0085] 심근 경색은 일반적으로 임상적으로 STEMI 및 NSTEMI로 분류된다. 이들은 심전도(ECG)의 변화를 기반으로 하며, 의사 또는 기타 숙련된 의료진이 진단할 수 있다. 심근 경색의 유형은 문헌[Thygesen et al. (2018)]에 제시된 심근 경색의 보편적인 정의에 따라 정의되거나 이로부터 유래될 수 있다.
- [0086] 본원에 기술된 치료 방법에서, 재조합 아피라제 단백질은 P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여된다. 본 맥락에서 용어 "~와 함께"의 사용은 투여 후(예를 들어, 30분 이내, 또는 1시간 이내, 또는 2시간 이내, 또는 3시간 이내), P2Y₁₂ 억제제(및/또는 이의 대사산물) 및 재조합 아피라제 단백질 둘 다가 환자의 혈류에서 생체이용 가능함(즉, 활성 효과를 가짐)을 의미하고자 한 것이다. 동물 모델에서, 재조합 아피라제 단백질 AZD3366의 투여는 (용량에 따라) 5분 이내에 항혈소판 효과를 포함한 현저한 효소 활성을 초래하였고, (용량에 따라) 3 내지 4주 동안 기준선으로 되돌아가지 않은 반면, P2Y₁₂ 억제제는 투여 후 활성화되는 데 일반적으로 더 오래 걸린다. 예를 들어, 티카그렐러의 최대 활성은 일반적으로 투여 후 약 2시간까지 관찰되지 않으며, 이는 8시간을 초과하여 유지된다.
- [0087] 따라서, 재조합 아피라제 단백질이 P2Y₁₂ 억제제와 함께 투여되도록 하기 위하여, 재조합 아피라제 단백질과 P2Y₁₂ 억제제가 동시에 물리적으로 투여되는 것이 항상 필요한 것은 아니다. 오히려, 투여 후 재조합 아피라제 단백질과 P2Y₁₂ 억제제 둘 다가 환자의 혈류에서 생체이용 가능하다면, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제 중 하나가 먼저 투여될 수 있고, 그 후 나머지 작용제가 나중에(예를 들어, 1시간 이상 후에) 투여될 수 있다.
- [0088] 나아가, 허혈 사건을 나타내는 일부 환자는 예를 들어, 이전 허혈 사건 후 유지 용량의 일부로서, 이미 P2Y₁₂ 억제제를 정기적으로 투여하는 중일 수 있다. 이러한 환자는 본원에서 "현재 P2Y₁₂ 억제제를 이용한 치료를 받고 있음"으로 지칭된다. 예를 들어, 90 mg 용량의 티카그렐러는 일반적으로 유지 용량의 일부로서 1일 2회 투여된다. 본원의 방법에 따라 재조합 아피라제 단백질이 투여되는 이러한 환자에서, 또 다른 용량의 P2Y₁₂ 억제제를 항상 투여할 필요는 없을 수 있는데, 이러한 억제제(및/또는 이의 대사산물)는 환자의 혈류에서 여전히 생체활

성인 것으로 간주되기 때문이다. 대안적으로, 혈류에서 생리활성 P2Y₁₂ 억제제의 수준을 보충하기 위해 정상 로딩 용량보다 감소된 용량의 P2Y₁₂ 억제제가 투여될 수 있다. 예를 들어, 티카그렐러의 경우, 티카그렐러가 환자의 혈류에서 여전히 생체활성인 경우, 일반적인 180 mg의 로딩 용량과는 반대로, 60 mg 또는 90 mg 또는 150 mg의 용량이 투여될 수 있다. 효과적인 투여량은 숙련된 의사 또는 기타 숙련된 의료진에 의해 결정될 수 있다. 그러나 바람직하게는, 환자가 현재 P2Y₁₂ 억제제를 이용한 치료를 받고 있더라도, 방법은 여전히 P2Y₁₂ 억제제(예를 들어, 로딩 용량)를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0089] P2Y₁₂ 억제제의 평균 제거 반감기, P2Y₁₂ 억제제의 평균 제거 반감기의 2배 초과, 또는 P2Y₁₂ 억제제의 평균 제거 반감기의 3배 초과, 또는 P2Y₁₂ 억제제의 평균 제거 반감기의 5배 초과, 또는 약 10일에 해당하는 기간 이내에 마지막 용량의 억제제가 투여된 경우, P2Y₁₂ 억제제는 환자의 혈류에서 여전히 생체활성인 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, 티카그렐러의 경우, 평균 제거 반감기는 티카그렐러의 경우 7시간이고 이의 활성 대사산물의 경우 9시간이다. 따라서, 티카그렐러는 마지막 용량이 마지막 9시간 이내, 마지막 18시간 이내, 마지막 27시간 이내, 마지막 36시간 이내, 또는 마지막 45시간 이내였다면, 환자의 혈류에서 생체활성인 것으로 간주될 수 있다. 대안적으로, P2Y₁₂ 억제제는 투여 중단 후 활성이 기준선으로 되돌아갈 때까지(이는 티카그렐러의 경우 5일 후임) 혈류에서 생체활성인 것으로 간주될 수 있다.

[0090] 허혈 사건을 나타내는 다른 환자는 이전에 P2Y₁₂ 억제제를 투여받은 적이 없을 수 있거나, 또는 예를 들어, P2Y₁₂ 억제제가 환자의 혈류에서 더 이상 생체활성인 것으로 간주되지 않도록, 이전의 P2Y₁₂ 억제제 투여를 중단했을 수 있다. 이러한 환자는 "미경험" 환자로 지칭될 수 있다. 미경험 환자에서, P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질을 투여하기 위하여, 방법은 P2Y₁₂ 억제제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 것이 필요하다.

[0091] 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제는 조합 제형으로서, 예를 들어, 정맥 내 주사를 통해, 투여될 수 있다. 대안적으로, 환자에게의 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제의 투여는 동시적이거나 순차적일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 동시 투여는 본질적으로 동일한 시간에(예를 들어, 서로 10분 이내, 5분 이내, 또는 1분 이내에), 선택적으로 상이한 투여 경로를 통한, 환자에게의 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제 둘 다의 투여를 지칭한다. 예를 들어, 경구 투여에 의해 제공되는 P2Y₁₂ 억제제의 1분 이내의 재조합 아피라제 단백질의 정맥 내 주사는 동시 투여로 간주될 것이다.

[0092] 순차적인 투여가 사용되는 경우, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제는 서로 바람직하게는 24시간, 18시간, 12시간, 6시간, 2시간, 1시간 이내에, 또는 더욱 바람직하게는 30분 이내에 투여된다. 일부 구현예에서 재조합 아피라제 단백질이 먼저 투여된 후, P2Y₁₂ 억제제가 순차적으로 투여된다. 다른 구현예에서 P2Y₁₂ 억제제가 먼저 투여된 후, 재조합 아피라제 단백질이 순차적으로 투여된다.

[0093] 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 허혈 사건(예를 들어, 급성 관상동맥 증후군, 예컨대 STEMI)의 개시 후 24시간 이하, 또는 18시간 이하, 또는 12시간 이하, 또는 6시간 이하, 또는 4시간 이하, 또는 2시간 이하, 또는 1시간 이하, 또는 심지어 30분 이하 후에 P2Y₁₂ 억제제와 함께 환자에게 투여된다. 본원에 언급된 바와 같은 허혈 사건의 개시는 허혈 사건의 하나 이상의 증상(예를 들어, STEMI의 경우 흉통)의 개시 시 또는 진단 시(예를 들어, 급성 관상동맥 증후군의 경우 심전도를 통한)일 수 있고, 진단은 환자가 치료를 위해 병원에 도착하기 전에 또는 도착한 직후에 수행될 수 있다.

[0094] 바람직하게는, 급성 관상동맥 증후군 또는 AIS를 앓는 환자에 대해 수행되는 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, 경피적 관상동맥 중재술(PCI), 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법) 전에 P2Y₁₂ 억제제와 함께 재조합 아피라제 단백질이 환자에게 투여된다.

[0095] PCI는 풍선 혈관 성형술, 스텐트 이식, 회전 또는 레이저 축종절제술 및/또는 근접치료를 제한 없이 포함할 수 있다. 스텐트가 이식되는 경우, 스텐트는 당해 분야에 공지된 바와 같이, 제한 없이, 베어 메탈 스텐트, 약물용출 스텐트, 흡수성 스텐트 등일 수 있다.

[0096] 재조합 아피라제 단백질과 P2Y₁₂ 억제제의 조합에 의해 제공되는 심장 및 뇌 조직에 대한 보호 효과는 재관류 요법 후 순환 회복으로 인한 조직 또는 기능에 대한 임의의 손상을 예방 및/또는 완화하는 데 유용할 수 있다. 따

라서, 일부 구현예에서 방법은 재조합 아피라제 단백질을 투여한 후 48시간 미만, 24시간 미만, 12시간 미만, 6시간 미만 후에 환자에 대해 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법)을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제는 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법)을 수행하기 전에 환자에게 둘다 투여된다. 다른 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질은 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI)을 수행하기 전에 환자에게 투여되고, P2Y₁₂ 억제제는 예를 들어, 외과적 재관류 요법이 수행된 직후, 예를 들어, 6시간 이내, 4시간 이내, 2시간 이내, 또는 1시간 이내에 투여된다. 일부 구현예에서, 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제는 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법) 중에 환자의 혈류에서 생체이용 가능하게 남아 있다.

[0097] 본 개시는 i) 재조합 아피라제 단백질 및 P2Y₁₂ 억제제의 동시적 또는 순차적 투여; ii) 허혈 사건의 개시와 관련된 투여 시기; 및 iii) 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법)과 관련된 투여 시기에 관하여 위에 기술된 시기들 중 임의의 시기가 조합되는 구현예를 포함한다. 예를 들어, 방법은 허혈 사건의 개시의 6시간 이내에 재조합 아피라제 단백질을 투여하는 단계를 포함할 수 있고, 이 때, 방법은 12시간 미만, 또는 6시간 미만 내에 환자에 대해 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법)을 수행하는 단계를 추가로 포함하고, P2Y₁₂ 억제제는 재조합 아피라제 단백질 투여 후 6시간 이내에 환자에게 투여되며, 선택적으로 재조합 아피라제 단백질과 P2Y₁₂ 억제제 둘 다는 외과적 또는 비 외과적 재관류 요법(예를 들어, PCI, 혈전제거술 또는 혈전 용해 요법)을 수행하기 전에 환자에게 투여된다.

[0098] 본원에 기술된 임의의 방법은 아스피린을 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 아스피린은 일반적으로 P2Y₁₂ 억제제 및 재조합 아피라제 단백질에 개별 제형으로서 투여되며, P2Y₁₂ 억제제 및 재조합 아피라제 단백질 중 하나 또는 둘 모두에 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 아스피린은 P2Y₁₂ 억제제 투여 후 24시간, 18시간, 12시간, 6시간, 2시간, 1시간 이내에, 또는 더욱 바람직하게는 30분 이내에 투여된다. 일부 구현예에서, 아스피린은 재조합 아피라제 단백질 투여 후 24시간, 18시간, 12시간, 6시간, 2시간, 1시간 이내에, 또는 더욱 바람직하게는 30분 이내에 투여된다. 일부 구현예에서, 아스피린은 P2Y₁₂ 억제제 또는 재조합 아피라제 단백질과 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 아스피린은 허혈 사건(예를 들어, 급성 관상동맥 증후군(예컨대 STEMI), AIS 또는 TIA)의 개시 후 24시간 이하, 또는 18시간 이하, 또는 12시간 이하, 또는 6시간 이하, 또는 4시간 이하, 또는 2시간 이하, 또는 1시간 이하, 또는 심지어 30분 이하 후에 P2Y₁₂ 억제제와 함께 환자에게 투여된다.

[0099] 아스피린은 50 mg 내지 325 mg의 용량, 예를 들어, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 162 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg 또는 350 mg으로 환자에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 아스피린은 50 mg 내지 200 mg, 또는 100 mg 내지 200 mg의 용량, 예를 들어, 162 mg으로 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 아스피린은 200 mg 내지 350 mg, 또는 250 내지 325 mg, 예를 들어, 300 mg 또는 325 mg으로 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 아스피린은 75 mg 내지 150 mg, 또는 75 mg 내지 100 mg의 용량으로 환자에게 투여된다.

[0100] 병태 치료의 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "치료"는 일반적으로 인간의 치료 및 요법에 관한 것으로, 이 때, 일부 원하는 치료 효과, 예를 들어 병태 진행의 억제가 달성되고, 진행률의 감소, 진행률의 중단, 병태의 퇴보, 병태의 개선, 및 병태의 치료를 포함한다. 예방적 조치로서의 처치(즉, 예방, 방지)도 포함된다.

[0101] 본원에 기술된 재조합 아피라제 단백질의 투여는 예를 들어 볼루스 주사, 정맥 내, 근육 내, 피하, 흡입, 연속 주입, 지속 방출, 또는 기타 제약상 허용 가능한 기법에 의해 제공될 수 있다. 이상적으로는 재조합 아피라제 단백질은 생리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 함유하는 제약상 허용 가능한 형태로 환자에게 투여될 것이다. 이러한 희석제 및 부형제는 중성 완충 식염수 용액, 항산화제(예를 들어, 아스코르브산), 저분자량 폴리펩티드(예를 들어, 폴리펩티드 < 10개 아미노산) 아미노산, 탄수화물(예를 들어, 글루코스, 텍스트로스, 수크로스, 또는 텍스트란), 퀼레이트화제, 예컨대, EDTA, 안정화제(예컨대, 글루타티온)으로 구성될 수 있다. 추가로, 재조합 아피라제 단백질을 위한 공동 기질, 예를 들어, 칼슘(Ca²⁺)이 효소의 최대 활성을 위하여 투여 시에 투여될 수 있다. 이러한 담체 및 희석제는 권장 투여량 및 농도에서 환자에게 무독성인 것으로 선택

된다.

[0102] 본원에 기술된 P2Y₁₂ 억제제의 투여는 사용되는 특정 P2Y₁₂ 억제제에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 티카그렐러, 클로피도그렐, 티클로피딘 및 프라수그렐은 일반적으로 제약상 허용 가능한 경우 투여량 형태로 환자에게 투여되는 반면, 칸그렐러는 일반적으로 정맥 내 주사를 통해 환자에게 투여된다.

[0103] 재조합 아피라제 단백질의 투여량 요건은 연령, 인종, 체중, 키, 성별, 치료 기간, 투여 방법, 재조합 아피라제 단백질의 생물학적 활성, 및 병태 또는 기타 임상 변수의 중증도에 따라 크게 달라질 수 있다. 효과적인 투여량은 숙련된 의사 또는 기타 숙련된 의료진에 의해 결정될 수 있다.

[0104] 방법은 적합한 용량(예를 들어, 로딩 용량)의 P2Y₁₂ 억제제, 및 선택적으로 존재할 경우 아스피린과 함께, 재조합 아피라제 단백질을 단일 유효 용량으로서 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 오로지 단일 유효 용량의 재조합 아피라제 단백질이 일반적으로 사용되는 동안, 방법은 만성 또는 유지 치료의 일부로서, 하나 이상의 경우 용량의 P2Y₁₂ 억제제를 주기적으로, 그리고 로딩 용량 다음에, 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, P2Y₁₂ 억제제는 예를 들어, 위에 기술된 유지 용량으로, 초기 로딩 용량 후에 수 주일, 수 개월 또는 심지어 수 년 동안, 1일 1회 또는 2회, 투여될 수 있다. P2Y₁₂ 억제제의 유지 용량은 당해 분야에 공지된 바와 같이 아스피린과 함께 투여될 수 있다. 허혈 사건 후 P2Y₁₂ 억제제의 만성 또는 유지 치료는 당해 분야에 공지되어 있으며, 적절한 용량 및 시기는 숙련된 의사 또는 다른 숙련된 의료진에 의해 결정될 수 있다.

[0105] 재조합 아피라제 단백질은 재조합 아피라제 단백질 및 제약상 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물로서 투여될 수 있다. P2Y₁₂ 억제제는 P2Y₁₂ 억제제 및 제약상 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물로서 투여될 수 있다.

[0106] 본원에서 사용되는 용어 "제약상 허용 가능한"은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이 논의되는 대상체의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하며, 합리적인 이득/위험비에 상응하는 화합물, 성분, 물질, 조성물, 투여량 형태 등에 관한 것이다. 각각의 담체, 희석제, 부형제 등은 또한 제형의 다른 성분과 양립 가능하다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다.

[0107] 구체적인 형태로 표현되거나 개시된 기능을 수행하기 위한 수단 또는 개시된 결과를 얻기 위한 방법 또는 공정의 관점에서 적절히 표현된, 전술한 설명, 또는 다음의 청구범위, 또는 첨부된 도면에 개시된 특징은, 개별적으로 또는 이러한 특징들의 임의의 조합으로, 본 발명을 이의 다양한 형태로 실현하는 데 이용될 수 있다.

[0108] 본 발명을 위에 기술한 예시적인 구현예와 함께 설명하였지만, 본 개시를 고려할 때, 여러 동등한 수정 및 변경은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 위에 기술된 본 발명의 예시적인 구현예는 예시적이며, 제한하는 것이 아닌 것으로 간주된다. 기술된 구현예에 대한 다양한 변형이 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다.

[0109] 의심을 피하기 위하여, 본원에 제공된 임의의 이론적 설명은 독자의 이해를 개선하기 위한 목적으로 제공된다. 본 발명자들은 이러한 이론적 설명 중 임의의 것에 의해 구애되기를 바라지 않는다.

[0110] 본원에서 사용되는 임의의 섹션 표제는 단지 구성적 목적을 위한 것으로, 기술된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0111] 이어지는 청구범위를 포함한 본 명세서 전반에 걸쳐, 맥락상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 "포함한다", "포함하는"과 같은 변형들은 언급된 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 포함하나, 임의의 다른 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 배제하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0112] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 맥락상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함함을 인식해야 한다. 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정 값에서부터, 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지로서 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 또 다른 구현예는 그 하나의 특정 값에서부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값들이 근사치로서 표현될 때, 선행어 "약"의 사용에 의해, 이 특정 값이 또 다른 구현예를 형성함이 이해될 것이다. 수치 값과 관련하여 용어 "약"은 선택적이고, 예를 들어, +/- 10%를 의미한다.

[0114] **실시예**

[0115] 실시예 1 - 돼지에서 수행된 실험의 재료 및 방법

[0116] **실험 설계**

[0117] 일반 사료를 먹인 Landrace 돼지(n=20; 체중 40 kg)를 다음을 받는 4개의 군으로 무작위(Excel 무작위 함수) 분배하였다:

I) 경구 위약-대조군(심근 경색(MI) 유도 2시간 전, n=5)

II) 로딩 용량의 티카그렐러(180 mg; n=5; 경구, MI 유도 2시간 전)

III) 로딩 용량의 티카그렐러(180 mg; n=5; 경구, MI 유도 2시간 전 및 1 mg/kg의 AZD3366 정맥 내, 재관류 10분 전)

IV) 로딩 용량의 티카그렐러(180 mg; n=5; 경구, MI 유도 2시간 전 및 3 mg/kg의 AZD3366 정맥 내, 재관류 10분 전)

[0122] 그 후, 본질적으로 문헌[Vilahur et al. 2016]에 기술된 바와 같이, 돼지는 중간 좌측 전방 하행 관상동맥의 일시적(90분) 풍선 폐쇄를 겪은 다음(실험적 MI), 재관류되었다. 다음 42일 동안, 돼지는 1일 경구 유지 용량의 위약(I군) 또는 티카그렐러(90 mg/bid, II군 내지 IV군)를 받았고, 연속 심장 자기 공명(CMR) 평가를 MI 후 제3일(초기 재형성 단계) 및 제42일(후기 재형성 단계)에 수행하였다.

[0123] 이 실험 설계는 도 1에 개략적으로 도시되어 있다.

[0124] **MI의 실험적 유도**

[0125] MI 유도 당일, 동물은 통증과 상처 감염에 대한 예방책으로 각각 부프레노르핀(0.03 mg/kg)과 세파졸린(25 mg/kg)을 받은 후, 케타민(30 mg/kg), 자일라진(2.2 mg/kg), 및 아트로핀(0.05 mg/kg)을 근육 내 주사로 투여하여 마취하였다. 진정되면 동물에 기관 내 삽관하고, 이소플루란 흡입(2%)으로 마취를 유지시켰다. MI 유도 절차를 시작하기 전에, 변연 귀 정맥에 위치시킨 선을 통해 악성 심실 부정맥의 예방책으로서 1.000 mL의 식염수 중 아미오다론(300 mg) 및 리도카인(150 mg)의 주입을 시작하였고(250 mL/h), 카테터 내 혈전 형성을 방지하기 위하여 헤파린 볼루스(100 U/kg)를 투여하였다. 이전에 문헌[Vilahur et al. 2016]에 기술된 바와 같이, 좌측 전방 하행 관상동맥의 중간 부분의 최소 침습성 폐쇄 흉부 심근 풍선 폐쇄에 의해 MI를 실험적으로 유도하였다. 완전한 관상동맥 허혈(혈관조영술로 확인함)은 90분 동안 유지되었다. 허혈 기간의 종료 시, 풍선을 완전히 납작하게 만들었고, 동물을 회복시켰다. 전체 과정에 걸쳐 심전도(ECG) 및 혈류역학 파라미터를 지속적으로 기록하였고, S5-1 섹터 어레이 변환기가 구비된 심장초음파 시스템(Phillips iE33)을 MI 유도 전후에 사용하여 좌심실 박출률(LVEF, 복장뼈주위 장축 단면도를 이용한 M-모드 분석)의 초기 악화를 문서화하였다(Vilahur et al. 2016).

[0126] **3T-CMR 획득 및 분석: 전체적 및 국부적 구조 및 기능 분석**

[0127] CMR 연구는 MI 후 제3일(초기 재형성 단계) 및 제42일(후기 재형성 단계)에 모든 동물에서 연속적으로 수행하였다. 3.0T-CMR 시스템(AchievaVR, Philips, 네덜란드 암스테르담 소재)에서 연구를 수행하였으며, CMR 이미지 획득은 치료의 측면에서 블라인드 처리된 CMR 전문 기술자에 의해 수행되었다. CMR 연구를 위해, 케타민, 자일라진 및 아트로핀으로 구성된 칵테일의 근육 내 주사로 동물을 마취시키고, 기계적 환기를 보장하기 위해 프로포폴의 지속적인 정맥 내 주입으로 유지시켰다. 가슴 위에 배치한 유연한 위상 배열 표면 코일을 사용하여 동물을 머리부터 바로 누운 자세로 위치시킨 후, ECG 게이팅을 사용하여 심장의 스텔 이미지를 획득하였다. 모든 경우에 다음과 같은 전용 CMR 시퀀스를 획득하였다: 심벽 운동(WM) 및 심장 기능을 평가하기 위한 '시네' 균형 정상 상태 자유 세차(bSSFP) 이미징 시퀀스; 심근 부종을 평가하기 위한 T2 가중 짧은 타우 반전 회복(T2w-STIR) 시퀀스; 미세혈관 폐쇄(리플로우 현상 없음)를 연구하기 위한 초기 가돌리늄 강화; 및 심근 피사의 양과 정도를 평가하기 위한 후기 가돌리늄 강화(LGE). 모든 CMR 연구는 동일한 계획을 따랐다. 먼저, 정찰 이미지[T1-터보 필드 에코(TFE) 시퀀스]를 획득하여 심장의 실제 축을 위치시키고 전체 심장을 포함하는 시야를 정의하였다. 그 후, bSSFP 시네 이미징을 수행 및 수직의 장축(4 챔버 및 2 챔버 뷰)과 전체 좌심실(LV)을 커버하는 여러 연속적인 단축 이미지에서 수행하였다. 단축 시네 시퀀스에서, WM 및 심장 기능의 올바른 평가를 보장하기 위해 모든 슬라이스의 24개의 심장 단계를 획득하였다. 시네 시퀀스가 획득되면, T2w-STIR 시퀀스를 획득하여 심근 부

종을 평가하였다. 그 후, 가돌리늄 기반 조영제(Gd-GTPA, MagnevistVR, Berlex Laboratories Inc., 미국 뉴저지 주 웨인 소재)를 0.1 mmol/kg의 용량으로 정맥 내 주사하였다. 초기 가돌리늄 강화 시퀀스를 조영제 투여 1분 후에 획득하였다. 조영제 투여 10분 후에 LGE 시퀀스를 얻었다. CMR 시퀀스에 대한 기술적 파라미터와 전체적 및 국부적 기능/해부 파라미터에 대한 분석 프로토콜에 대한 세부 사항은 이전에 발표되었다(Vilahur et al. 2016).

[0129] 실시예 2 - 심근 경색의 돼지 모델에서 심장 손상, 기능 및 출혈에 대한 AZD3366 및 티카그렐러의 효과

[0130] ADP아제의 재조합 가용성 형태인 AZD3366(APT102라고도 함)의 투여가 경색 크기 감소 및 심장 기능 개선 측면에서 티카그렐러 단독 투여에 추가적인 이점을 부여하는지를 조사하기 위한 실험을 수행하였다. 방법론 및 분석은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0132] 심장 손상 평가

돼지 동물 모델에서 심장 손상 평가 실험의 결과를 다음 표에 제공하였다:

MI 후 3 일의 CMR 에 의해 평가한 심장 손상				
	위약	티카그렐러	티카그렐러 + 1 mg/kg 의 AZD3366	티카그렐러 + 3 mg/kg 의 AZD3366
LV 질량	70.0 ± 4.1	81.3 ± 7.4	75.0 ± 3.6	76.5 ± 2.2
부종(gr)	20.4 ± 1.7	10.5 ± 0.8*	7.3 ± 1.7*	6.4 ± 0.8*†
LV 질량의 부종(%)	29.8 ± 1.9	13.1 ± 0.9*	9.8 ± 2.3*	8.4 ± 0.9*†
괴사(gr)	12.2 ± 1.5	6.6 ± 1.0*	5.2 ± 0.7*	3.2 ± 0.9*†
LV 질량의 괴사(%)	7.7 ± 1.5	8.2 ± 1.2*	7.0 ± 0.9*	4.2 ± 1.2*†

[0134] [0135] * 위약 대비 $p<0.05$; † 나머지 모두 대비 $p<0.05$

MI 후 42 일의 CMR 에 의해 평가한 심장 손상				
	위약	티카그렐러	티카그렐러 + 1 mg/kg 의 AZD3366	티카그렐러 + 3 mg/kg 의 AZD3366
LV 질량	100.6 ± 3.6	108.6 ± 6.9	107 ± 6.7	111.7 ± 9.4
괴사(gr)	7.9 ± 0.9	4.7 ± 1.0*	4.5 ± 1.7*	3.4 ± 1.2*†
LV 질량의 괴사(%)	7.8 ± 0.7	4.3 ± 0.8*	4.1 ± 1.5*	2.8 ± 1.0*†

[0136] [0137] * 위약 대비 $p<0.05$; † 나머지 모두 대비 $p<0.05$

[0138] 티카그렐러 단독과 비교하여 티카그렐러 + 3 mg/kg AZD 3366의 괴사 영역의 추가적인 감소 및 티카그렐러 + 1 mg/kg AZD3366의 수치상 더 낮은 괴사 영역은 조합의 용량 의존적인 증진된 심장보호 효과를 증명한다. 이 모델은 인간 질환에 대한 최선의 전임상 모델이므로, 이것은 인간에서의 치료 효과를 시사할 수 있는 가장 강력한 증거이다.

[0140] 심장 기능 평가

[0141] 돼지 동물 모델에서 심장 기능 평가 실험의 결과를 다음 표에 제공하였다:

CMR 에 의해 평가한 전체적 및 국부적 심장 기능					
	시간	위약	티카그렐러	티카그렐러 + 1 mg/kg 의 AZD3366	티카그렐러 + 3 mg/kg 의 AZD3366
LVEF%	BSL	58.7 ± 2.1	53.7 ± 2.8	55.4 ± 1.4	52.8 ± 2.2
	3 일	48.6 ± 2.0*	50.3 ± 2.9	46.4 ± 2.0	52.0 ± 3.5
	42 일	46.2 ± 3.0*	47.0 ± 4.4	46.6 ± 5.5	54.8 ± 3.8

[0142] *BSL(기준선) 대비 $p<0.05$

CMR 에 의해 평가한 전체적 및 국부적 심장 기능					
	시간	위약	티카그렐러	티카그렐러 + 1 mg/kg 의 AZD3366	티카그렐러 + 3 mg/kg 의 AZD3366
심벽 운동 (mm)	BSL	2.81	2.66	2.63	2.75
	3 일	1.11	1.88	1.73	2.68*
	42 일	1.82	2.55	2.64	3.09*

[0143] *나머지 모두 대비 $p<0.05$

[0144] 티카그렐러 단독과 비교하여 티카그렐러+3 mg/kg AZD 3366에서의 심벽 운동 점수의 추가적인 개선은 심근 경색 후 증진된 치유 및 심장 기능의 회복을 증명하고 있다. 감소된 경색 크기와 개선된 기능의 동시 발생은 급성 심장보호 작용 양식을 심장의 개선된 기능적 회복과 연결시킨다. 이 모델은 인간 질환에 대한 최선의 전임상 모델이므로, 이것은 인간에서의 치료 효과를 시사할 수 있는 가장 강력한 증거이다.

0149] 실시예 3 - 마우스 꼬리 출혈에 대한 AZD3366 및 티카그렐러의 효과

[0150] 본 연구의 목표는 마우스 생체 내에서 AZD3366의 단독 또는 티카그렐러와 조합 시 출혈 위험 및 혈소판 응집 억제를 평가하는 것이다.

[0152] 실험 프로토콜

[0153] C57B16 마우스에게 AZD3366 또는 비히클의 정맥 내 볼루스를 투여하였다. 개별 군에서, 마우스에게 AZD3366 및 티카그렐러, 또는 티카그렐러만을 볼루스로서, 그리고 티카그렐러의 연속 주입으로 투여하였다. 투여군, 투여 용량 및 투여 부피는 아래 표에 기술된 바와 같았다:

군	처리	용량		부피	
		볼루스 (mg/kg)	주입 (μ g/kg*분)	볼루스 (mL/kg)	주입 (μ L/kg*분)
비히클(V)	5% 만니톨 +완충액	NA	NA	1.0±1.0	200±NA
티카그렐러(T)	티카그렐러 +완충액	1.2±NA	30±NA	1.0±1.0	200±NA
AZD3366(AZD1)	5% 만니톨 +AZD3366	NA±1.0	NA±NA	1.0±1.0	200±NA
AZD3366(AZD3)	5% 만니톨 +AZD3366	NA±3.0	NA±NA	1.0±1.0	200±NA
티카그렐러+AZD3366 (T+AZD1)	티카그렐러 +AZD3366	1.2±1.0	30±NA	1.0±1.0	200±NA

[0154]

[0156] 완충액=20 mmol/L의 트리스, 150 mmol/L의 NaCl, pH 7.4. NA; 해당 없음. 12마리의 동물이 각 연구군에 포함되었다.

[0157] t=20분에서, 꼬리 절개가 이루어졌고, 혈액 손실과 BT를 60분 동안 기록하였다. 실험 종료 시인 t=80분에서, AZD3366 및 티카그렐러의 혈소판 응집 평가 및 후속 혈장 농도 분석을 위하여 복부 대동맥으로부터 혈액 샘플을 수집하였다.

[0159] 출혈 모델

[0160] 투여 20분 후, 꼬리 끝의 5 mm를 절단하여 출혈을 개시하였다. 꼬리를 물로 행구고, 혼모글로빈 감수성 장치에 넣었다. 혈액과 물 혼합물을 통한 빛 투과를 기록하고, PharmLab 소프트웨어(V6.0, AstraZeneca R&D, 스웨덴 예테보리 소재)를 이용하여 흡광도로 변환하였다. 95% 미만의 투과율은 출혈로 정의되었다. 총 혈액 손실(출혈 곡선 아래 영역, t=20분에서 t=80분까지: 누적 혈액 손실 대 시간, 흡광도*s, abs*s) 및 출혈 시간(BT)을 꼬리 절단 시작부터 60분에 걸쳐 측정하였다.

[0162] 혈액 및 혈장 분석

[0163] 복부 대동맥의 혈액 샘플을 Terumo[®] Neolus 27G, 0.4 x 20 mm 바늘(Terumo Europe N.V., Leuven Belgium)과 함께 Omnipix[®]-F 1 mL 주사기(Braun Medical AG, Emmenbruecke, 독일)에 수집하였다. 레피루딘(Refludan[®] Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc), 10 μL, 5 mg/mL에서 최대 1 mL의 혈액까지(이는 7 μmol/L의 최종 혈액 농도를 제공함)를 항응고제로 사용하였다. Multiplate[®] 임피던스 응집측정기를 이용하여 혈소판 응집에 전혈을 사용하였다. 5분 동안 10000*g에서 원심분리하여 나머지 혈액으로부터 혈장을 제조하였다(Ole Dich, Hvidovre, 덴마크). 혈장을 새로운 튜브로 옮기고, 티카그렐러 및 AZD3366의 총 혈장 농도의 추후 분석을 위해 -20°C에 보관하였다.

[0164] 채혈 직후, 175 μL의 전혈을 Multiplate[®] (Roche Diagnostics GmbH, 독일 만하임 소재) 미니 테스트 세포에 첨가하고, 175 μL의 37°C의 예열된 식염수(9 mg/mL, Fresenius Kabi AG, Bad Homberg, 독일)와 혼합하였다. 3분 후, 12 μL의 아데노신 이인산염(ADP, Roche Diagnostics, 독일 만하임 소재)을 최종 분석 농도 6.5 μmol/L까지 첨가하였다. 반응을 6분 동안 측정하였으며, 데이터를 경시적으로 기록된 응집 단위(AU)의 곡선 아래 평균 면적(AUC)으로 표현하였다(AU*분).

[0165] 티카그렐러의 혈장 농도를 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법(LC-MS/MS) 방법으로 결정하였다.

[0166] AZD3366의 혈장 농도를 96-웰 플레이트에 코팅된 단일클론 마우스 항-AZD3366 항체(mAb2567, Covance, 미국 뉴저지 주 프린스턴 소재)를 사용한 AZD3366의 포획 및 기질로서 TMB를 이용하는 호스래디시 페옥시다제 접합 다클론 토끼 항-AZD3366 항체(pAb3939-HRP, Covance)를 이용한 결합된 AZD3366의 검출을 포함하는 ELISA에 의해 결정하였다.

[0168] 결과

[0169] 혈액 손실 및 BT의 결과를 아래 표에 제시하고, 도 2에 도시하였다.

혈액 손실 및 출혈 시간(BT)				
군	혈액 손실(abs*s)		BT(s)	
	증간값	범위(최소~최대)	증간값	범위(최소~최대)
비히클	160	28~778	655	66~2734
티카그렐러	1157a, b, c	139~1542	3433a, d	420~3587
AZD3366 1.0 mg/kg	157	34~1415	589	107~3582
AZD3366 3.0 mg/kg	342e	52~1072	1438	268~2931
티카그렐러+ AZD3366 1.0 mg/kg	961	176~1464	2657	930~3585

[0170]

[0171] n=12/연구군. 혈액 손실(abs*s) 및 출혈 시간(BT, s). 꼬리 끝을 절단한 후 60분 동안 출혈을 측정하였다. 티카그렐러, 1.2 mg/kg의 볼루스 주입 후, 유지 주입액으로 30 μg/kg*분, AZD3366, 1.0 mg/kg 또는 3.0 mg/kg, 볼루스 주입.

[0172]

a 비히클 대비 p<0.001

[0173]

b AZD3366 1.0 mg/kg 대비 p<0.01

[0174]

c AZD3366 3.0 mg/kg 대비 p<0.001

[0175]

d AZD3366 3.0 mg/kg 대비 p<0.05

[0176]

e 티카그렐러+AZD3366 대비 p<0.05.

[0177]

비히클 투여된 동물과 비교하여 티카그렐러 처리된 동물에서의 혈액 손실 및 BT는 각각 7.2배(p<0.001) 및 5.2배(p<0.001) 증가하였다. 대조적으로, 1 또는 3 mg/kg의 AZD3366으로의 처리는 비히클 대비 혈액 손실 또는 BT의 통계적으로 유의미한 증가와 관련이 없었다. 나아가, 조합된 티카그렐러 및 AZD3366군의 혈액 손실 및 BT는 티카그렐러만 투여된 동물군에서 관찰된 것과 비교하여 다르지 않았다.

[0178]

혈소판 응집(PA) 결과는 다음 표에 기재하였다:

마우스에서 AZD3366(AZD) 및 티카그렐러(T)의 혈소판 응집 억제 및 혈장 농도			
군	PA(AU*분)	T(μmol/L)	AZD(μg/mL)
비히클	469±34	-	-
T	2±2	8±0.2	-
AZD1	2±2	-	20±1.9
AZD3	0±0	-	66±2.5
T + AZD1	0±0	8±0.3	20±0.7

[0179]

[0180] 따라서, 티카그렐러(T)와 반대로, AZD3366(1 및 3 mg/kg)에 의한 완전한 혈소판 응집(PA) 억제는 증가된 출혈과 관련이 없었다(도 2). 또한, AZD3366 및 티카그렐러의 조합 투여는 티카그렐러 단독에 대해 관찰된 것 이상으로 출혈을 증가시키지 않았다.

[0181]

이 실험으로부터의 결과는 티카그렐러와 AZD3366의 조합이 티카그렐러 단독에 대해 관찰된 것 이상으로 출혈을 증가시키지 않음을 증명한다.

[0183]

참고문헌

[0184]

본 발명 및 본 발명과 관련된 분야의 기술 수준을 더욱 충분히 설명하고 개시하기 위하여 다수의 간행물을 위에 인용하였다. 이러한 참고문헌에 대한 전체 인용은 아래에 제공된다. 이러한 참고문헌 각각의 전체가 본원에 포

함된다.

- [0185] Asaria, P., Elliott, P., Douglass, M., Obermeyer, Z., Soljak, M., Majeed, A., & Ezzati, M. (2017). Acute myocardial infarction hospital admissions and deaths in England: a national follow-back and follow-forward record-linkage study. *The Lancet. Public health*, 2(4), e191-e201. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(17\)30032-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(17)30032-4)
- [0186] Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimsky, P., & ESC Scientific Document Group (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*, 39(2), 119-177. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>
- [0187] Roth G. A. et al, (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study (2017) *The Lancet*, 392, 1736-1788, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7).
- [0188] Kyu H. H. et al, (2018) Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392, 1859-2922 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32335-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32335-3).
- [0189] Powers W. J. et al. (2018) Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 50, e344-e418. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000211>
- [0190] Wang Y., Liu M., Pu C. (2017) 2014 Chinese guidelines for secondary prevention of ischemic stroke and transient ischemic attack: Compiled by the Chinese Society of Neurology, Cerebrovascular Disease Group. *International Journal of Stroke*, 12(3), 302-320. <https://doi.org/10.1177/1747493017694391>.
- [0191] Johnston S. C. et al (2020) Ticagrelor and Aspirin or Aspirin Alone in Acute Ischemic Stroke or TIA. *New England Journal of Medicine* 383, 207-17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916870>.
- [0192] Jernberg, T., Hasvold, P., Henriksson, M., Hjelm, H., Thuresson, M., & Janzon, M. (2015). Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *European heart journal*, 36(19), 1163-1170. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu505>
- [0193] Wang Y. et al (2013) Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack. *New England Journal of Medicine*, 369(1), 11-9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215340>
- [0194] Johnston S. C. et al. (2018); Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA. *New England Journal of Medicine*, 379, 215-225. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800410>.
- [0195] Robson, S. C., Wu, Y., Sun, X., Knosalla, C., Dwyer, K., & Enjyoji, K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 31(2), 217-233. <https://doi.org/10.1055/s-2005-869527>
- [0196] Sun, Guanghua & Zhao, Xiurong & Grotta, James & Savitz, Sean & Chen, Ridong & Aronowski, Jaroslaw. (2011). Apyrase, APT102, Improves the Beneficial Effect of rt-PA In Experimental Thromboembolic Stroke. E302-E302.
- [0197] Tan, Z., Li, X., Turner, R. C., Logsdon, A. F., Lucke-Wold, B., DiPasquale, K., Jeong, S. S., Chen, R., Huber, J. D., & Rosen, C. L. (2014). Combination treatment of r-tPA and an optimized human apyrase reduces mortality rate and hemorrhagic transformation 6h after ischemic stroke in aged female rats.

European journal of pharmacology, 738, 368-373. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.052>

- [0198] Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., & Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, 138(20), e618-e651. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>
- [0199] Vilahur G, Gutierrez M, Casani L, Varela L, Capdevila A, Pons-Llado G, Carreras F, Carlsson L, Hidalgo A, Badimon L. Protective effects of ticagrelor on myocardial injury after infarction. *Circulation* 2016;134:1708-1719.
- [0200] Wallentin, L., Becker, R. C., Budaj, A., Cannon, C. P., Emanuelsson, H., Held, C., Horow, J., Husted, S., James, S., Katus, H., Mahaffey, K. W., Scirica, B. M., Skene, A., Steg, P. G., Storey, R. F., Harrington, R. A., PLATO Investigators, Freij, A., & Thorsin, M. (2009). Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*, 361(11), 1045-1057. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904327>
- [0201] 표준 분자 생물학 기법에 대해서는 Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 참고.

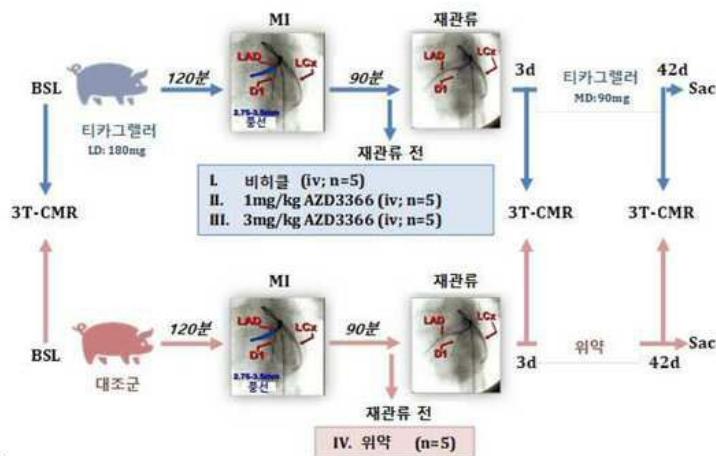
서열

식별자	설명	서열
서열번호 1	인간 CD39L3 아미노산 서열 (서열번호 1의 아미노산 잔기 48~485는 <u>밀줄</u> <u>표시함</u>)	MVTVLIRQPCEQAGLKALYRTPTTIALVVLLVSIVVLLVSITWVQIHK QEVLPPGLKYGIVLDAGSSRTIVYVYQWPAAEKENNTIGVVSQTFKCSV KGSGISSYGNNPQDVPRAFEECMQVKVGQVPSHLHGSTPIHLGATAG MRLLRLQNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIISGQEEGVVIGWI TANYLMGNFLEKNLWHMNVHPHGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKMD DLNTSDIMQVSLYGYVYTLYTHSFQCYGRNEAEKKFLAMILLQNSPTK NHLTNPACYPRDYSISFTMGHVFDLSLCVTDQRPESYNPNDVITFEGTG DPSLCKEKVASIFDFKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPVAFAGFYYT ASALNLSGSFSLDTFNSSAWNFCSQNWSQLPLLPKFDEVYARSYCF SANYIYHLEVNGYKFTETWPQIHFEKEVGNSSIAWSLGMLSLTNQI IPAESPLIRLPIEPPVFVGTIAFFTAALLCLAFLAYLCSATRRKRH SEHAFDRAVDSD
서열번호 2	AZD3366 아미노산 서열 (N 말단 EVLP는 <u>밀줄 표시함</u> , R67G 및 T69R 아미노산 치환은 <u>밀줄 표시한</u> <u>굵은 활자체</u>)	EVLPPGLKYGIVLDAGSSGTRVYVYQWPAAEKENNTIGVVSQTFKCSVK GSGISSYGNNPQDVPRAFEECMQVKVGQVPSHLHGSTPIHLGATAGM RLLRLQNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIISGQEEGVVIGWIT ANYLMGNFLEKNLWHMNVHPHGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKMD LNTSDIMQVSLYGYVYTLYTHSFQCYGRNEAEKKFLAMILLQNSPTK HLTNPCYPRDYSISFTMGHVFDLSLCVTDQRPESYNPNDVITFEGTG PSLCKEKVASIFDFKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPVAFAGFYTA SALNLSGSFSLDTFNSSAWNFCSQNWSQLPLLPKFDEVYARSYCF ANYIYHLEVNGYKFTETWPQIHFEKEVGNSSIAWSLGMLSLTNQI PAESPLIRLPIEPPV

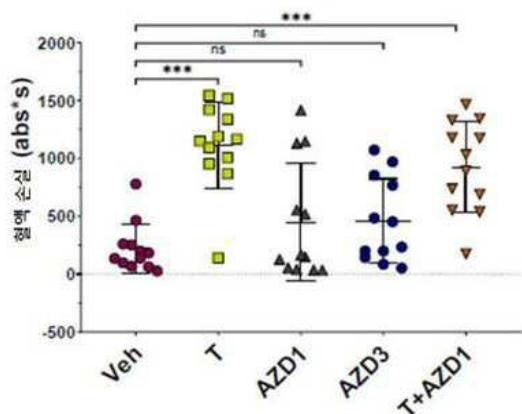
[0204]

도면

도면1



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> AstraZeneca AB

<120> Combination treatment

<130> 201079

<150> US 63/067,338

<151> 2020-09-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 529

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Thr Val Leu Thr Arg Gln Pro Cys Glu Gln Ala Gly Leu Lys

1 5 10 15

Ala Leu Tyr Arg Thr Pro Thr Ile Ile Ala Leu Val Val Leu Leu Val

20 25 30

Ser Ile Val Val Leu Val Ser Ile Thr Val Ile Gln Ile His Lys Gln

35 40 45

Glu Val Leu Pro Pro Gly Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly

50 55 60

Ser Ser Arg Thr Thr Val Tyr Val Tyr Gln Trp Pro Ala Glu Lys Glu

65 70 75 80

Asn Asn Thr Gly Val Val Ser Gln Thr Phe Lys Cys Ser Val Lys Gly

85 90 95

Ser Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Pro Gln Asp Val Pro Arg Ala

100 105 110

Phe Glu Glu Cys Met Gln Lys Val Lys Gly Gln Val Pro Ser His Leu

115 120 125

His Gly Ser Thr Pro Ile His Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu

130 135 140

Leu Arg Leu Gln Asn Glu Thr Ala Ala Asn Glu Val Leu Glu Ser Ile

145 150 155 160

Gln Ser Tyr Phe Lys Ser Gln Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Gln Ile

165 170 175

Ile Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Tyr Gly Trp Ile Thr Ala Asn Tyr

180 185 190

Leu Met Gly Asn Phe Leu Glu Lys Asn Leu Trp His Met Trp Val His

195 200 205

Pro His Gly Val Glu Thr Thr Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser

210 215 220

Thr Gln Ile Ser Phe Val Ala Gly Glu Lys Met Asp Leu Asn Thr Ser

225	230	235	240
Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr			
245	250	255	
His Ser Phe Gln Cys Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Glu Lys Lys Phe Leu			
260	265	270	
Ala Met Leu Leu Gln Asn Ser Pro Thr Lys Asn His Leu Thr Asn Pro			
275	280	285	
Cys Tyr Pro Arg Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Met Gly His Val Phe			
290	295	300	
Asp Ser Leu Cys Thr Val Asp Gln Arg Pro Glu Ser Tyr Asn Pro Asn			
305	310	315	320
Asp Val Ile Thr Phe Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ser Leu Cys Lys Glu			
325	330	335	
Lys Val Ala Ser Ile Phe Asp Phe Lys Ala Cys His Asp Gln Glu Thr			
340	345	350	
Cys Ser Phe Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Ile Lys Gly Pro Phe Val			
355	360	365	
Ala Phe Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Ala Ser Ala Leu Asn Leu Ser Gly			
370	375	380	
Ser Phe Ser Leu Asp Thr Phe Asn Ser Ser Thr Trp Asn Phe Cys Ser			
385	390	395	400
Gln Asn Trp Ser Gln Leu Pro Leu Leu Pro Lys Phe Asp Glu Val			
405	410	415	
Tyr Ala Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Ala Asn Tyr Ile Tyr His Leu Phe			
420	425	430	
Val Asn Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Glu Thr Trp Pro Gln Ile His Phe			
435	440	445	
Glu Lys Glu Val Gly Asn Ser Ser Ile Ala Trp Ser Leu Gly Tyr Met			
450	455	460	
Leu Ser Leu Thr Asn Gln Ile Pro Ala Glu Ser Pro Leu Ile Arg Leu			
465	470	475	480

Pro Ile Glu Pro Pro Val Phe Val Gly Thr Leu Ala Phe Phe Thr Ala
 485 490 495
 Ala Ala Leu Leu Cys Leu Ala Phe Leu Ala Tyr Leu Cys Ser Ala Thr
 500 505 510
 Arg Arg Lys Arg His Ser Glu His Ala Phe Asp His Ala Val Asp Ser
 515 520 525
 Asp

<210> 2
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AZD3366
 <400> 2
 Glu Val Leu Pro Pro Gly Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly

1 5 10 15
 Ser Ser Gly Thr Arg Val Tyr Val Tyr Gln Trp Pro Ala Glu Lys Glu
 20 25 30
 Asn Asn Thr Gly Val Val Ser Gln Thr Phe Lys Cys Ser Val Lys Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Pro Gln Asp Val Pro Arg Ala
 50 55 60
 Phe Glu Glu Cys Met Gln Lys Val Lys Gly Gln Val Pro Ser His Leu
 65 70 75 80
 His Gly Ser Thr Pro Ile His Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu
 85 90 95
 Leu Arg Leu Gln Asn Glu Thr Ala Ala Asn Glu Val Leu Glu Ser Ile
 100 105 110
 Gln Ser Tyr Phe Lys Ser Gln Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Gln Ile
 115 120 125
 Ile Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Tyr Gly Trp Ile Thr Ala Asn Tyr
 130 135 140

Leu Met Gly Asn Phe Leu Glu Lys Asn Leu Trp His Met Trp Val His
 145 150 155 160
 Pro His Gly Val Glu Thr Thr Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser
 165 170 175
 Thr Gln Ile Ser Phe Val Ala Gly Glu Lys Met Asp Leu Asn Thr Ser
 180 185 190
 Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr
 195 200 205
 His Ser Phe Gln Cys Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Glu Lys Lys Phe Leu
 210 215 220
 Ala Met Leu Leu Gln Asn Ser Pro Thr Lys Asn His Leu Thr Asn Pro
 225 230 235 240
 Cys Tyr Pro Arg Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Met Gly His Val Phe
 245 250 255
 Asp Ser Leu Cys Thr Val Asp Gln Arg Pro Glu Ser Tyr Asn Pro Asn
 260 265 270
 Asp Val Ile Thr Phe Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ser Leu Cys Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Ala Ser Ile Phe Asp Phe Lys Ala Cys His Asp Gln Glu Thr
 290 295 300
 Cys Ser Phe Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Ile Lys Gly Pro Phe Val
 305 310 315 320
 Ala Phe Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Ala Ser Ala Leu Asn Leu Ser Gly
 325 330 335
 Ser Phe Ser Leu Asp Thr Phe Asn Ser Ser Thr Trp Asn Phe Cys Ser
 340 345 350
 Gln Asn Trp Ser Gln Leu Pro Leu Leu Pro Lys Phe Asp Glu Val
 355 360 365
 Tyr Ala Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Ala Asn Tyr Ile Tyr His Leu Phe
 370 375 380
 Val Asn Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Glu Thr Trp Pro Gln Ile His Phe

385 390 395 400
Glu Lys Glu Val Gly Asn Ser Ser Ile Ala Trp Ser Leu Gly Tyr Met
405 410 415
Leu Ser Leu Thr Asn Gln Ile Pro Ala Glu Ser Pro Leu Ile Arg Leu
420 425 430
Pro Ile Glu Pro Pro Val
435