



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202207937 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：109139411

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K31/519 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P7/02 (2006.01)

(30)優先權：2020/08/19 美國

63/067,388

(71)申請人：瑞典商阿斯特捷利康公司 (瑞典) ASTRAZENECA AB (SE)

瑞典

(72)發明人：卡爾森 萊夫 CARLSSON, LEIF (SE)；尼蘭德 斯文 NYLANDER, SVEN (SE)；

菲爾斯特龍 奧拉 FJELLSTROM, OLA (SE)；拜迪蒙 莉娜 BADIMON, LINA (ES)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：2 共 55 頁

(54)名稱

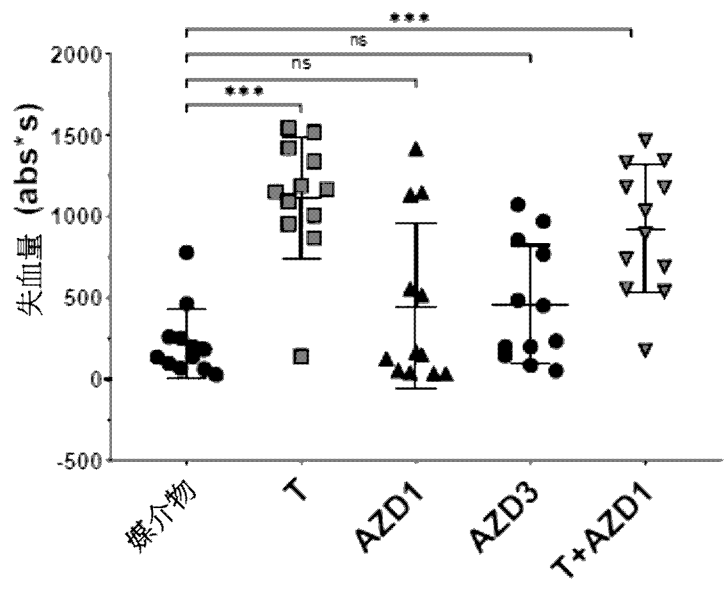
組合治療

(57)摘要

本發明關於藉由連同 P2Y₁₂ 抑制劑一起施用重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白來治療患者中的缺血性事件，特別是 ST 段抬高型心肌梗塞和急性缺血性卒中之方法。

The present invention relates to methods for treating ischemic events in a patient, especially ST-segment elevation myocardial infarction and acute ischemic stroke, by administering a recombinant apyrase protein in conjunction with a P2Y₁₂inhibitor.

指定代表圖：



【圖2】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 組合治療

【英文發明名稱】 Combination treatment

【中文】

本發明關於藉由連同P2Y₁₂抑制劑一起施用重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白來治療患者中的缺血性事件，特別是ST段抬高型心肌梗塞和急性缺血性卒中之方法。

【英文】

The present invention relates to methods for treating ischemic events in a patient, especially ST-segment elevation myocardial infarction and acute ischemic stroke, by administering a recombinant apyrase protein in conjunction with a P2Y₁₂ inhibitor.

【指定代表圖】 圖2

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 組合治療

【英文發明名稱】 Combination treatment

【技術領域】

【0001】 本發明關於藉由連同P2Y₁₂抑制劑一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白來治療患者中的缺血性事件，特別是ST段抬高型心肌梗塞和急性缺血性卒中（acute ischemic stroke）之方法。

【先前技術】

【0002】 心肌梗塞（MI）係全世界入院和死亡之主要原因（Asaria等人2017）。如果不加治療，MI會由於缺乏血流（缺血）並因此缺氧而導致對心肌之不可逆損傷。因此，MI治療之主要目標係藉由再灌注治療來加快正常冠狀動脈血流的恢復，目的係減少心肌損傷。再灌注治療通常涉及與諸如經皮冠狀動脈介入治療（PCI）等手術及非手術技術組合，使用諸如溶血栓治療等療法來增加血流量並減少血栓形成。早期再灌注和PCI係較佳的並且與改善預後相關，有指南建議PCI應在MI症狀發作12小時內進行（Ibanez等人2018）。

【0003】 腦血管疾病係指影響血液向腦部循環之病狀，並且包括急性缺血性卒中（AIS）和短暫缺血性發作（TIA）。腦血管疾病係全世界導致死亡和嚴重長期殘疾的主要原因（Roth等人2018和Kyu等人2018）。與MI相似，主要目標係藉由灌注治療來加快正常腦血流的恢復，目的係減少腦組織損傷。再灌注治療涉及與諸如血栓切除術（thrombectomy）等介入技術組合，使用諸如溶血栓治療

等療法來增加血流量並減少血栓形成。早期再灌注係較佳的並且與改善的預後相關，有指南推薦，在符合條件的患者中，應在症狀發作的4.5小時內進行溶血栓再灌注並且在症狀發作的6小時內進行血栓切除術（Powers等人2018）。

【0004】有幾種治療策略可用於處理血栓形成以防止繼發性血栓事件，並且分為兩類：基於蛋白質的治療劑和小分子治療劑。小分子治療劑的實例包括P2Y₁₂受體抑制劑，諸如氯吡格雷（clopidogrel）、替卡格雷（ticagrelor）、普拉格雷（prasugrel）和坎格雷洛（cangrelor），它們因能夠抑制血小板和預防血凝塊而著稱。已在臨床試驗中證明了氯吡格雷和替卡格雷兩者在降低心血管發病率和死亡率方面之有效性，並且這兩種藥物均已被批准用於預防血栓形成事件。例如，國家衛生與臨床優化研究所（National Institute for Health and Care Excellence，NICE）推薦替卡格雷與低劑量阿司匹林組合使用長達12個月，作為成人急性冠狀動脈症候群（ACS）的治療。然而，該等P2Y₁₂受體抑制劑確實會增加出血風險，並因此需要注意確保患者根據處方資訊和當前指南接受這種治療。在當前治療指南中具有降低非心源性栓塞性AIS或TIA後的繼發卒中風險的最高級別的證據的抗血小板劑係阿司匹林，但是也使用氯吡格雷。最近，在美國（Power等人2018）和中國（Wang等人2017）指南中推薦在AIS或TIA的24小時內使用阿司匹林和氯吡格雷之組合，並且替卡格雷和阿司匹林也顯示出優於單獨阿司匹林之益處（Johnston等人2020）。

【0005】最近的研究已經探索了重組腺苷三磷酸雙磷酸酶作為基於蛋白質的治療劑之用途。腺苷三磷酸雙磷酸酶（胞外ATP二磷酸水解酶）構成了一類催化ATP代謝為ADP和ADP代謝為AMP的酶。在體內，藉由腺苷三磷酸雙磷酸酶誘導ATP和ADP水解而產生的AMP被泛在表現的細胞外CD73/胞外-5'-核苷酸酶

轉化為腺苷。第一種已知的人類腺苷三磷酸雙磷酸酶CD39最初被鑒定為活化淋巴細胞和內皮細胞上的一種細胞表面蛋白，並且各種體外和體內研究顯示腺苷三磷酸雙磷酸酶能夠維持血管完整性並在生理上抑制炎症和血栓形成（Robson等人2005）。

【0006】 腺苷三磷酸雙磷酸酶藉由降低ATP和ADP的水平來降低ATP和ADP與所有三種血小板P2受體（P2X₁、P2Y₁和P2Y₁₂）的相互作用，從而起到抑制血小板活化和募集的作用。與P2Y₁₂受體的小分子抑制劑形成對比，使用腺苷三磷酸雙磷酸酶來消耗ADP和ATP水平不會導致臨床前模型中出血水平的增加。腺苷三磷酸雙磷酸酶除具有抗血小板作用外，還具有心臟保護作用和腦組織保護作用，這被認為係藉由以下方式介導的：i) 促炎性ATP和ADP分子的消耗；和ii) 藉由下游腺苷三磷酸雙磷酸酶作用產生的增加的抗炎腺苷水平。Moeckel等人（2014）的圖1中提供了內源性腺苷三磷酸雙磷酸酶作用機理的更多資訊。

【0007】 Moeckel等人（2014）報導了人類CD39家族的成員可溶性CD39L3的重組優化形式的設計和產生。所得的重組蛋白稱為「APT102」或「AZD3366」。作者報導稱，這種重組蛋白表現出的二磷酸腺苷酶活性係天然腺苷三磷酸雙磷酸酶的四倍且血漿半衰期係天然腺苷三磷酸雙磷酸酶的50倍，並且在動物模型中用APT102進行治療減小了梗塞面積而不會增加出血時間。在該模型中，單獨用氯吡格雷進行的相應治療沒有心臟保護作用，而將APT102與氯吡格雷組合的治療並未改變單獨用APT102所見的保護功效（Moeckel等人（2014）的圖6）。Tan等人（2014）報導稱組織纖維溶酶原活化劑（tPA）和APT102的組合與單獨的tPA或APT102相比，降低了死亡率和梗死體積。數據還表明，APT102可以安全地擴大tPA介導的再灌注的治療窗口，而不會增加出血轉化。

【0008】 儘管最佳的抗血小板和抗血栓治療涉及P2Y₁₂受體抑制劑(諸如替卡格雷)，每年仍有10%左右發生新的心肌梗塞事件的風險，並且增加該等治療的強度會增加出血風險而不會提高功效(Wallentin等人，2009；Jernberg等人，2015)。最近在AIS/TIA患者中探索用氯吡格雷或替卡格雷和阿司匹林進行的雙重抗血小板治療的益處的研究表明，在急性情況下(事件發生後1-3個月)，仍有5%-8%發生新的缺血性卒中的風險(Wang等人2013，Johnston等人2018，2020)。

【0009】 因此，仍然需要可以用於治療缺血性事件諸如心肌梗塞和急性缺血性卒中(AIS)的有效且安全的治療方法，以及可以防止復發性缺血性事件的安全治療方法。鑒於以上考慮而設計了本發明。

【發明內容】

【0010】 本發明之諸位發明人已經確定，與單獨使用單獨的P2Y₁₂抑制劑相比，連同P2Y₁₂抑制劑一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白提供改善的心臟保護益處。這表明組合治療可以用作心臟缺血性事件諸如心肌梗塞(例如ST段抬高型心肌梗塞)和腦部缺血性事件(例如急性缺血性卒中)的有效治療，並且例如可用於預防或改善由缺血性事件引起的傷害(例如，由於心肌梗塞形成的心臟損傷，或由於急性缺血性卒中形成的腦損傷)，並且可用於預防復發性缺血性事件。

【0011】 具體而言，諸位發明人證明，在心肌梗塞(MI)的動物模型中，連同P2Y₁₂抑制劑(例如替卡格雷)一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白(例如AZD3366)在減小梗塞面積和改善心臟功能方面驚人地有效。然而在Moeckel

等人(2014)的圖6中報導的結果則稱使用P2Y₁₂抑制劑不影響用單獨的AZD3366所觀察到的心臟保護作用。

【0012】此外，不希望受到理論的束縛，據信由組合治療提供的改善的心臟保護作用至少部分地是由P2Y₁₂抑制劑導致細胞外腺苷水平升高引起的。由於據報導AZD3366的心臟保護作用還涉及遞增的細胞外腺苷水平，因此出乎意料的是，作用於相同途徑和調節相同終產物的水平的兩種藥劑（P2Y₁₂抑制劑和重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白）的組合使用會誘導比藉由單獨使用單一藥劑所觀察到的更強的心臟保護作用。

【0013】還確定了連同替卡格雷一起投與AZD3366與單獨的替卡格雷相比，在動物模型中並未顯著增加出血水平。這很重要，因為這表明與單獨使用P2Y₁₂抑制劑相比，例如用於治療那些已經批准P2Y₁₂抑制劑用於治療的病狀，就使用組合治療時增加出血而言不存在顯著的附加風險。

【0014】該等結果與先前的臨床試驗觀察結果形成對比，在臨床試驗中一直觀察到，在相同途徑或互補途徑上增加抗血小板活性或增加抗血栓形成活性會增加與任何有益功效作用一起之出血風險。

【0015】因而，所提出的組合出乎意料地是其中可以藉由靶向和增強歸因於諸如MI的環境中的相同生物途徑的作用來改善淨臨床益處之第一實例。

【0016】因此，本揭露的一個方面提供了一種治療患者中的缺血性事件之方法，該方法包括連同P2Y₁₂抑制劑一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【0017】在另一方面，本揭露提供了一種在治療患者中的缺血性事件之方法中使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，該方法包括向該患者投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，其中該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同P2Y₁₂抑制劑一起投與。

【0018】在另一方面，本揭露提供了一種在治療患者中的缺血性事件之方法中使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑，該方法包括將該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同該P2Y₁₂抑制劑一起投與於該患者。

【0019】在另一方面，本揭露提供了一種在治療患者中的缺血性事件之方法中使用的P2Y₁₂抑制劑，該方法包括向該患者投與該P2Y₁₂抑制劑，其中該P2Y₁₂抑制劑連同重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白一起投與。

【0020】在另一方面，本揭露提供了重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑在製造用於治療患者中的缺血性事件的藥物中之用途，該治療包括連同P2Y₁₂抑制劑一起將重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白投與於患者。

【0021】P2Y₁₂抑制劑可以選自由替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定、普拉格雷和坎格雷洛組成之群組。在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑選自由替卡格雷、氯吡格雷和普拉格雷組成之群組。較佳的是，P2Y₁₂抑制劑係替卡格雷或氯吡格雷。甚至更較佳的是，P2Y₁₂抑制劑係替卡格雷。

【0022】重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以是重組人CD39L3腺苷三磷酸雙磷酸酶，視需要係可溶性重組人CD39L3腺苷三磷酸雙磷酸酶。如US 7247300 B1、EP 2133430 B1和EP 2523971 B1中任一項所述，腺苷三磷酸雙磷酸酶可以是可溶性CD39L3或ADP酶增強的腺苷三磷酸雙磷酸酶。示例性的重組人CD39L3腺苷三磷酸雙磷酸酶在這裡作為SEQ ID NO: 2提供。

【0023】在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白係可溶性CD39L3蛋白，其包含與SEQ ID NO: 1的位置49-485至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的胺基酸序列，其中重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白保留了ADP酶活性和ATP酶活性。在一些實施方式中，與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含一個或多個修飾（例如胺基酸取代），其中所述參考腺苷三磷酸雙磷酸酶可以是野

生型腺苷三磷酸雙磷酸酶（例如具有SEQ ID NO: 1中列出的胺基酸序列的腺苷三磷酸雙磷酸酶）或可溶性腺苷三磷酸雙磷酸酶（例如，具有SEQ ID NO: 1的位置49-485中列出的胺基酸序列的可溶性腺苷三磷酸雙磷酸酶）。

【0024】該等修飾可以產生與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比增加的ADP酶活性或與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相同的ADP酶活性以及與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比降低的ATP酶活性。在一些實施方式中，該一個或多個修飾可以包括位置67和69處的取代或由位置67和69處的取代組成，其中該等位置係根據SEQ ID NO: 1編號的。位置67處的取代可以是取代為甘胺酸，而位置69處的取代可以是取代為精胺酸，或者位置67處的取代可以是取代為丙胺酸，而位置69處的取代可以是取代為精胺酸。較佳的是，位置67處的取代係取代為甘胺酸而位置69處的取代係取代為精胺酸。

【0025】在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含與SEQ ID NO: 2（AZD3366）中列出的胺基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少98%、至少99%相同的胺基酸序列。在特定的示例性實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含如SEQ ID NO: 2列出的胺基酸序列。

【0026】在一些情況下，發生缺血性事件時，患者可能已經在接受P2Y₁₂抑制劑之治療。例如，替卡格雷在治療急性冠狀動脈症候群（ACS）中的處方資訊描述以180 mg「負荷」劑量開始治療，然後在ACS事件後的第一年投與90 mg「維持」劑量每天兩次，並且在一年後投與60 mg每天兩次。因此，患者可能在過去2年中先前經歷過既往缺血性事件，目前正在接受P2Y₁₂抑制劑長期治療，例如當這裡治療的缺血性事件發生時，服用替卡格雷每天兩次。如上所述，儘管進行了最佳的抗血小板和抗血栓治療，仍然存在發生新的缺血性事件的風險。

【0027】例如，患者可能在進行本發明方法之前的先前72小時，或先前36小時，或先前48小時，或先前24小時，或先前20小時，或先前16小時內，或先前

12小時，或先前8小時，或先前6小時內，已經接受了（已經投與了）P2Y₁₂抑制劑。在一些實施方式中，例如在P2Y₁₂抑制劑係替卡格雷的情況下，患者在先前8-16小時例如12小時內已經接受了P2Y₁₂抑制劑（即作為每天投與兩次的維持劑量的一部分）。

【0028】 在其他情況下，患者目前可能未接受P2Y₁₂抑制劑的治療。將此類患者描述為「原初」患者。這包括患者從未投與P2Y₁₂抑制劑的情況以及患者先前已經投與了P2Y₁₂抑制劑但在進行本發明方法之前的至少24小時、48小時、72小時或一週未進行投與的情況。

【0029】 在較佳的實施方式中，該方法包括除了重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白之外，還將P2Y₁₂抑制劑投與於患者（例如，正在接受該P2Y₁₂抑制劑或另一種P2Y₁₂抑制劑治療的患者，或原初患者）。通常，該方法包括以單獨配製物的形式投與P2Y₁₂抑制劑和重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，該等單獨配製物單獨投與，例如同時或依次投與。熟練的醫師或其他熟練的醫務人員可以確定向患者投與每種治療劑的最合適的方式。

【0030】 在使用依次投與時，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑較佳的是在彼此的24小時、12小時、1小時或更較佳的是在30分鐘內投與。在一些實施方式中，先投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，然後依次投與P2Y₁₂抑制劑。在其他實施方式中，先投與P2Y₁₂抑制劑，然後依次投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【0031】 在一些實施方式中，正在治療的缺血性事件係急性冠狀動脈症候群。急性冠狀動脈症候群包括ST段抬高型心肌梗塞（STEMI）、非ST段抬高型心肌梗塞（NSTEMI）和不穩定型心絞痛。在較佳的實施方式中，正在治療的缺血性事件係患者中的ST段抬高型心肌梗塞（STEMI）。

【0032】如本文所證明的，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白（例如AZD3366）和P2Y₁₂抑制劑（例如替卡格雷）的組合投與在心肌梗塞的臨床前動物模型中產生心臟保護作用，組合投與與安慰劑以及單獨使用P2Y₁₂抑制劑治療相比，減小了梗死面積並且改善了心臟功能。如上所述，心肌梗塞後的早期再灌注係較佳的並且與改善的預後相關。因此，在患有急性冠狀動脈症候群（例如STEMI）的患者中連同P2Y₁₂抑制劑一起投與腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，應該較佳的是在急性冠狀動脈綜合徵發作後儘快進行，並且較佳的是盡可能接近患者接受經皮冠狀動脈介入治療（PCI）的時間，諸如在患者接受經皮冠狀動脈介入治療（PCI）之前。

【0033】在其他實施方式中，正在治療的缺血性事件係急性缺血性卒中。每年，在70000人口中，有100名新患者發生缺血性卒中。在不治療的情況下，一年內有55名患者死亡或產生依賴性。100名患者中的大多數發生輕度或短暫性卒中，並且僅接受抗血小板藥物以減少復發。約25-35名患者接受再灌注治療，這使5-6名患者免於死亡或依賴性，並增加了無殘疾人數。因此，降低急性缺血性卒中（AIS）之發病率和死亡率係臨床上尚未滿足的需求。

【0034】臨床前和臨床試驗已經評估了P2Y₁₂抑制劑和阿司匹林在缺血性卒中事件後用於治療和/或預防卒中之用途。此外，臨床前數據已經證明重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白AZD3366可在缺血性卒中動物模型中用於增強再灌注，減少再阻塞和減少顱內出血（Sun等人，2011；Tan等人，2014）。因此認識到，本文所述之臨床前心肌梗塞動物模型中與AZD3366和P2Y₁₂抑制劑的組合投與相關的有益結果在缺血性卒中的治療中也可以是有益的。例如，與單獨的P2Y₁₂抑制劑相比，組合治療除了預防復發性缺血性事件外，還可以減小患有缺血性卒中的患者的梗死面積和/或減少腦部損傷，並且實現這種效果而不會顯著增加出血的風險。

【0035】如下文更詳細所述，口服P2Y₁₂抑制劑起效所需的時間通常為數小時，這意味著即使在缺血性事件（例如急性冠狀動脈症候群）發作後很早就投與P2Y₁₂抑制劑，當患者未受到保護而免於相關損傷（例如，由於心肌梗塞形成的心臟損傷）或復發性缺血性事件的風險時，有幾個小時的時間。相比之下，已經在臨床前模型中證實重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白AZD3366在靜脈內投與的幾分鐘內就具有高水平的活性，並且根據劑量維持這種活性超過24小時（Moekel等人2015）。因此，認識到，早期投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，這將在心肌梗塞或AIS的初始階段提供抗血栓形成作用和組織保護作用，然後在患者的血流中有足夠水平的P2Y₁₂抑制劑可生物利用，以便主要發揮其抗血栓形成作用

【0036】因此，在一些實施方式中，在缺血性事件（例如急性冠狀動脈症候群諸如STEMI，或急性腦血管事件諸如AIS或TIA）發作後24小時或更短時間，或18小時或更短時間，或12小時或更短時間，或6小時或更短時間，或4小時或更短時間，或2小時或更短時間，或1小時或更短時間，或甚至30分鐘或更短時間連同P2Y₁₂一起向患者投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。在一些實施方式中，該方法進一步包括在連同P2Y₁₂抑制劑一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白後少於48小時、少於24小時、少於12小時、少於6小時、少於3小時、少於2小時、或少於1小時，對患者進行手術或非手術再灌注治療（例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療）。在特定的實施方式中，缺血性事件係心肌梗塞（例如STEMI），而再灌注治療係PCI。在特定的實施方式中，缺血性事件係AIS，而再灌注治療係血栓切除術。在特定實施方式中，缺血性事件係心肌梗塞（例如STEMI）或AIS，而再灌注治療係溶血栓治療（例如組織纖維溶酶原活化劑）。在特定的實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑在手術或非手術再灌注治療（例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療）期間在患者的血流中保持生物可利用。

【0037】 在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白以10 mg至1000 mg的劑量投與。

【0038】 在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑係替卡格雷並且以60 mg至200 mg，例如60 mg、90 mg、120 mg或180 mg的劑量投與。在一些實施方式中，替卡格雷以其推薦的180 mg負荷劑量投與。

【0039】 在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑係氯吡格雷並且以75 mg至600 mg，例如75 mg、150 mg、225 mg、300 mg、375 mg、450 mg、525 mg或600 mg的劑量投與。在一些實施方式中，氯吡格雷以其推薦的300 mg或600 mg的負荷劑量投與。

【0040】 在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑係噻氯匹定並且以250 mg至500 mg，例如250 mg或500 mg的劑量投與。在一些實施方式中，噻氯匹定以其推薦的500 mg負荷劑量投與。

【0041】 在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑係普拉格雷並且以5至60 mg，例如5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg或60 mg的劑量投與。在一些實施方式中，普拉格雷以其推薦的60 mg負荷劑量投與。

【0042】 在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑係坎格雷洛並且以30 µg/kg靜脈推注的劑量投與，然後以每分鐘4 µg/kg靜脈輸注的劑量投與。

【0043】 在一些實施方式中，該方法進一步包括向患者投與阿司匹林，例如使得重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同P2Y₁₂抑制劑和阿司匹林一起投與。在該等實施方式中，該方法通常包括以單獨配製物的形式投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白、P2Y₁₂抑制劑和阿司匹林，該等單獨配製物單獨投與，例如同時或依次投與。阿司匹林可以50 mg至325 mg的劑量投與。

【0044】 在一些實施方式中，該方法進一步包括向患者投與溶血栓治療（例如tPA），例如使得重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同P2Y₁₂抑制劑和溶血栓治療一起投與。在該等實施方式中，該方法通常包括以單獨配製物的形式投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白、P2Y₁₂抑制劑和溶血栓治療，該等單獨配製物單獨投與，例如同時或依次投與。

【0045】 本發明之另一方面關於一種套組（kit），該套組包含本文所述之重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑，視需要其中該套組進一步包含阿司匹林。

【0046】 本發明包括所描述的方面和較佳的特徵的組合，除非明顯不容許或明確避免此類組合的情況外。

【圖式簡單說明】

【0047】 現將參考附圖來討論說明本發明原理之實施方式和實驗，在附圖中：

【0048】 [圖1]說明了實驗方案，該實驗方案用於檢查在心肌梗塞的豬動物模型中，就減少梗死面積和改善心臟功能而言，投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白AZD3366是否比單獨投與替卡格雷賦予額外的益處。BSL = 基線；MI = 心肌梗塞；Sac = 處死。

【0049】 [圖2]示出了從小鼠尾出血實驗獲得的結果，示出了在投與替卡格雷（T）、1 mg/kg AZD3366（AZD1）、3 mg/kg AZD3366（AZD3）以及組合投與AZD3366和替卡格雷（T + AZD1）之後測得的失血量。結果證明，組合投與AZD3366和替卡格雷並未使失血量增加高於單獨的替卡格雷（T）所見的失血量。

示出的是平均值 ± SEM。ns；不顯著，***；P < 0.001（單因素方差分析 + Dunnet 多重比較檢驗）。

【實施方式】

【0050】 現將參考附圖來討論本發明之各方面和實施方式。對於熟悉該項技術者而言，其他方面和實施方式將是顯而易見的。該文本中提及的所有文檔均藉由援引併入本文。

重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白

【0051】 腺苷三磷酸雙磷酸酶（EC 3.6.1.5）催化三磷酸腺苷（ATP）的磷酸酐鍵水解為一磷酸腺苷（AMP）以及二磷酸腺苷（ADP）的磷酸酐鍵水解為 AMP。CD39 家族成員（也稱為胞外核苷三磷酸二磷酸水解酶（E-NTPD 酶）家族成員）代表了一些最佳表徵的腺苷三磷酸雙磷酸酶。人 CD39 家族成員包括下表中列出的天然蛋白質：

天然蛋白質的名稱	另外的名稱	NCBI 登錄號
CD39	ATPD 酶、胞外腺苷三磷酸雙磷酸酶、NTPD 酶1	U87967.1
CD39L1	NTPD 酶2、胞外 ATP 酶	AF144748.1
CD39L2	NTPD 酶6	AY327581.1
CD39L3	NTPD 酶3、CD39L3、HB6	AF034840.2
CD39L4	NTPD 酶5、ER-UDP 酶、PCPH	AF039918.1
LALP70	UDP 酶、NTPD 酶4	AF016032.1
LALP1	NTPD 酶7	AF269255.1
肝小管胞外 ATP 酶	NTPD 酶8、hATPD 酶	AY430414.1

【0052】 在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白係重組人腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白或其工程化型式。在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷

酸酶蛋白係重組人腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白或其工程化型式的片段。一般而言，如本文中相對於本發明之重組人腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白或其工程化型式使用的術語「片段」涉及保留全長蛋白質的酶活性（諸如ADP酶和ATP酶活性）的N-端和/或C-端縮短的蛋白質。在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白係CD39家族的成員，例如上表中列出的天然蛋白質中的任一種，或其工程化型式。

【0053】 重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以是可溶性重組人腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，例如缺乏一些或全部構成腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的跨膜結構域的胺基酸殘基的腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，它可以是CD39家族的成員。例如，人CD39L3係SEQ ID NO: 1中所示的529個胺基酸殘基蛋白，特定的示例性可溶性CD39L3腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白具有如SEQ ID NO: 1的位置49-485列出的胺基酸序列。

【0054】 在重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的上下文中，術語「工程化」或「其工程化型式」意指該工程化蛋白具有與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白相似但不相同的胺基酸序列。通常參考演算法GAP（威斯康辛州GCG套裝軟體，美國聖地牙哥的阿賽樂德網路公司（Accelrys Inc, San Diego USA））來定義序列同一性。GAP使用Needleman和Wunsch演算法來比對兩個完整序列，從而最大化匹配數並最小化空位數。可以較佳的是使用GAP，但是也可以使用其他演算法，例如BLAST（使用Altschul等人（1990）之方法）、FASTA（使用Pearson和Lipman（1988）之方法）或Smith-Waterman演算法（Smith和Waterman（1981））或TBLASTN程式（Altschul等人（1990），同上），通常採用預設參數。具體而言，可以使用psi-Blast演算法。

【0055】 參考腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以是野生型腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白（例如全長CD39L3腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白）或可溶性腺苷三磷酸雙磷

酸酶蛋白（例如具有如SEQ ID NO: 1的位置49-485列出的胺基酸序列的蛋白質）。工程化的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以包含一個或多個胺基酸取代，例如與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比改變酶活性（例如ADP酶活性）的取代，和/或基本上不改變參考腺苷三磷酸雙磷酸酶的酶活性的功能保守性取代。工程化的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以例如在蛋白質的N-端或C-端，包含基本上不改變參考腺苷三磷酸雙磷酸酶的酶活性（例如ADP酶和ATP酶活性）的一個或多個胺基酸缺失或添加。工程化的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以具有與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的胺基酸序列。例如，SEQ ID NO: 2中列出的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白（AZD3366）係可溶性CD39L3腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的工程化型式，其具有如SEQ ID NO: 1的位置49-485列出的胺基酸序列。

【0056】 在一個較佳的實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白係CD39L3蛋白或其工程化型式。重組腺苷三磷酸雙磷酸酶可具有與SEQ ID NO: 1至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的胺基酸序列。在一個甚至更較佳的實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白係可溶性CD39L3蛋白或其工程化型式。重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以具有與如SEQ ID NO: 1的位置49-485列出的胺基酸序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的胺基酸序列。

【0057】 包括CD39L3工程化型式（例如增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶）在內的可溶性重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的設計、產生和用途在US 7247300 B1、EP 2133430 B1和EP 2523971 B1中有描述，其全部藉由援引以其全文併入本文。

本文所述之重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以是那些出版物中描述的任何腺苷三磷酸雙磷酸酶。

【0058】 EP 2133430 B1描述了ADP酶增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶。該等ADP酶增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶包括參考腺苷三磷酸雙磷酸酶的修飾形式，其中修飾產生與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比增加的ADP酶活性或與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相同的ADP酶活性以及與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比降低的ATP酶活性。示例性的ADP酶增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶包括在CD39L3的位置67和69處包含取代的那些，其中位置編號係依照SEQ ID NO: 1的。具體地，ADP酶增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶包括蛋白質8742，其包含R67G和T69R取代；以及蛋白質8906，其包含R67A和T69R取代。

【0059】 EP 2133430 B1中揭露了用於測定這種活性的示例性ATP酶和ADP酶測定法。例如，可以在37°C下在1 ml溶液中測定純化的可溶性ADP酶增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶的ATP酶和ADP酶活性，該溶液含有8 mM CaCl₂、200 μM底物（對於ATP酶而言為ATP或對於ADP酶而言為ADP）、50 mM咪唑和50 mM Tris (pH 7.5) (Picher等人，Biochem. Pharmacol. [生化藥理學] (1938) 51: 1453)。可以終止反應並且可以藉由添加0.25 ml孔雀石綠試劑來測量釋放的無機磷酸鹽 (Baykov等人，Anal. Biochem. [分析生物化學] (1988) 171: 266)。基於在630 nm下的分光光度分析，一個單位的ATP酶（或ADP酶）對應於在37°C下每分鐘釋放1 μmol無機磷酸鹽。可以藉由將數據擬合到例如Michaelis-Menten方程中來獲得酶的關鍵動力學常數（諸如K_m和k_{cat}）。可用於監測生物化學功能的其他測定法包括但不限於放射測定法、HPLC測定法（兩者均由Gayle III等人描述的 (J. Clin Invest. [臨床研究雜誌] (1998) 101: 1851-1859)）或放射TLC測定法（由Marcus, A.J. 等人描述的 (J. Clin Invest. [臨床研究雜誌] (1991) 88: 1690-1696)）。

【0060】 因此，與具有如SEQ ID NO: 1的位置49-485列出的胺基酸序列的參考腺苷三磷酸雙磷酸酶（即CD39L3的可溶性型式）相比，本文所述之重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以包含一個或多個修飾（例如胺基酸取代）。該等修飾可以產生與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比增加的ADP酶活性或與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相同的ADP酶活性以及與參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比降低的ATP酶活性。在一些實施方式中，該一個或多個修飾可以包括位置67和69處的取代或由位置67和69處的取代組成，其中該等位置係根據SEQ ID NO: 1編號的。位置67處的取代可以是取代為甘胺酸，而位置69處的取代可以是取代為精胺酸，或者位置67處的取代可以是取代為丙胺酸，而位置69處的取代可以是取代為精胺酸。較佳的是，位置67處的取代係取代為甘胺酸而位置69處的取代係取代為精胺酸。

【0061】 EP 2523971 B1描述了腺苷三磷酸雙磷酸酶和產生腺苷三磷酸雙磷酸酶之方法，該等腺苷三磷酸雙磷酸酶包含同源N-端，例如使得80%的腺苷三磷酸雙磷酸酶分子具有構成EVLP的相同N-端。將該等具有同源N-端的蛋白質描述為具有在3.0至4.5範圍內的平均等電點和/或在兔子和豬體內具有增強之半衰期。

【0062】 因此，本文所述之重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以包含同源N-端，使得超過80%的腺苷三磷酸雙磷酸酶分子具有相同的N-端，該N-端為EVLP，如EP 2523971 B1中所述。

【0063】 在某些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以進一步包含一個或多個功能保守性取代（例如，除了上述的ADP酶增強型腺苷三磷酸雙磷酸酶中的取代之外）。與等效的未取代的蛋白質相比，功能保守性取代係不影響（或基本上不影響）一種或多種功能特性（例如酶活性）的取代。在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個功能保守性取代。

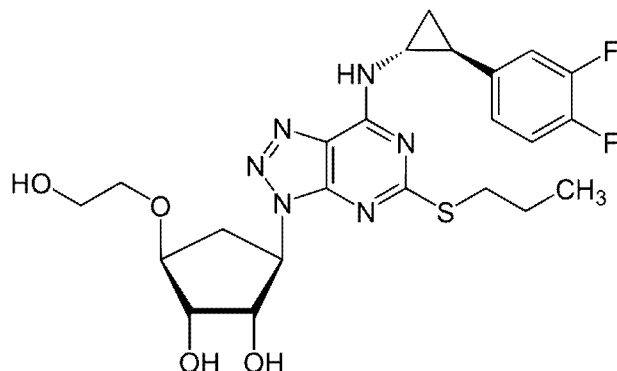
【0064】在較佳的實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含與SEQ ID NO: 2至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的胺基酸序列，視需要其中位置67處的胺基酸殘基係甘胺酸並且位置69處的胺基酸殘基係精胺酸，其中該等位置係根據SEQ ID NO: 1編號的。例如，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，具有1個或多個（例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個）功能保守性取代，視需要其中位置67處的胺基酸殘基係甘胺酸並且位置69處的胺基酸殘基係精胺酸，其中該等位置係根據SEQ ID NO: 1編號的。在示例性的實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

P2Y₁₂抑制劑

【0065】P2Y₁₂抑制劑可以選自由以下組成的列表：替卡格雷（ticagrelor）、氯吡格雷（clopidogrel）、噻氯匹定（ticlopidine）、普拉格雷（prasugrel）和坎格雷洛（cangrelor）。本文提及P2Y₁₂抑制劑包括該等化合物中的任何一種以及任何代謝物，例如活性代謝物。在一些實施方式中，P2Y₁₂抑制劑可以選自由以下組成的列表：替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定和普拉格雷，例如選自由以下組成的列表：替卡格雷、氯吡格雷和普拉格雷。在較佳的實施方式中，P2Y₁₂抑制劑可以是替卡格雷或氯吡格雷。在特別較佳的實施方式中，P2Y₁₂抑制劑係替卡格雷。

【0066】替卡格雷[(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-二氟苯基)環丙基]胺基]-5-(丙硫基)-3H-1,2,3-三唑并[4,5-d]嘧啶-3-基]-5-(2-羥基乙氧基)-1,2-環戊二醇]係可逆性結合的口服P2Y₁₂受體拮抗劑。替卡格雷還藉由抑制平衡型核苷運輸蛋白-1（ENT-1）來提高局部內源性腺苷水平，並且有文檔證明會加強腺苷

誘導的反應。替卡格雷經批准用於預防急性冠狀動脈症候群和既往心肌梗塞患者中的血栓形成事件，並且在監管文檔中批准用於AIS和短暫性缺血性發作。它具有以下化學結構：



【0067】 替卡格雷係稱為BRILINTA®（或在歐洲稱為BRILIQUE）的藥品中的活性成分，該藥品已在包括美國和歐洲在內的多個管轄區批准使用。替卡格雷目前以60 mg和90 mg速釋片的形式銷售。WO 2008/024045揭露了用於口服投與的某些含有替卡格雷的藥物配製物。WO 2017/182589揭露了替卡格雷的快速崩解口服劑型。

【0068】 替卡格雷通常在口服投與後被迅速吸收。與氯吡格雷和普拉格雷不同，替卡格雷不是前驅藥，不需要代謝活化就能發揮活性。替卡格雷也被廣泛代謝，其中替卡格雷及其活性且大致與P2Y₁₂等效的代謝物（AR-C124910XX）構成血漿中的主要循環組分。替卡格雷及其活性代謝物的血漿濃度以劑量依賴性方式增加；分別在大約1.5小時和2.5小時內達到峰值濃度。在一個劑量後大約2小時觀察到血小板凝集的最大抑制作用，並且這在一個劑量後維持超過8小時。替卡格雷及其活性代謝物的平均消除半衰期在藥物標籤中分別描述為7小時和9小時。停藥後，血小板活性在5天後恢復到基線。

【0069】 在較佳的實施方式中，替卡格雷以180 mg負荷劑量的形式連同重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白一起口服投與。替卡格雷可以以口服分散片（ODT）的形式投與，例如WO 2017/182589中所述。可以在負荷劑量之後，投與一個或

多個後續維持劑量，例如不含重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。如上所述，在180 mg的初始負荷劑量之後，替卡格雷的處方資訊描述在ACS事件後的第一年投與90 mg的維持劑量每天兩次並且在一年後投與60 mg每天兩次。該一個或多個後續維持劑量可以包括每天兩次的90 mg替卡格雷劑量，或每天兩次的60 mg替卡格雷劑量。處方資訊進一步描述與75-100 mg的阿司匹林日維持劑量一起投與替卡格雷。因此，該一個或多個後續維持劑量可以進一步包括投與75-100 mg阿司匹林的日劑量。

【0070】 P2Y₁₂-受體抑制劑可以是氯吡格雷。氯吡格雷通常經由口服途徑投與。在一些實施方式中，氯吡格雷以300 mg或600 mg負荷劑量的形式連同重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白一起投與。一個或多個後續維持劑量可以包含約75 mg的氯吡格雷並且可以在負荷劑量之後投與，例如不含重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。如同上述替卡格雷一樣，維持劑量的氯吡格雷可以與75-100 mg的阿司匹林日劑量一起投與。

【0071】 氯吡格雷係前驅藥，需要代謝活化才能發揮其活性。口服劑量後大約30-60分鐘，出現活性代謝物的血漿峰值濃度，在投與後2小時左右觀察到劑量依賴性的血小板凝集抑制作用並且在約8小時後觀察到峰值血小板抑制作用。口服投與單劑量後，可以在2小時內觀察到劑量依賴性的血小板凝集抑制作用。75 mg單劑量後氯吡格雷的消除半衰期為大約6小時，而其活性代謝物的消除半衰期為大約30分鐘。停藥後，血小板凝集和出血時間在約5天後逐漸恢復到基線。

【0072】 P2Y₁₂-受體抑制劑可以是普拉格雷。普拉格雷通常經由口服途徑投與。在一些實施方式中，普拉格雷以60 mg負荷劑量的形式連同重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白一起投與。一個或多個後續維持劑量可以包含約5 mg或10 mg的普拉格雷並且可以在負荷劑量之後投與，例如不含重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋

白。如同上述替卡格雷一樣，維持劑量的普拉格雷可以與75-100 mg的阿司匹林日劑量一起投與。

【0073】 普拉格雷係前驅藥，並且快速代謝為具有藥理活性的代謝物。在給藥後30分鐘出現活性代謝物的血漿峰值濃度，並且在約2小時出現峰值血小板抑制作用。它的消除半衰期為約7.4小時。

【0074】 P2Y₁₂-受體抑制劑可以是噻氯匹定。噻氯匹定通常經由口服途徑投與。在一些實施方式中，噻氯匹定通常經由口服途徑投與。在一些實施方式中，噻氯匹定以500 mg負荷劑量的形式連同重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白一起投與。一個或多個後續維持劑量可以包含約250 mg的噻氯匹定並且可以在負荷劑量之後投與，例如不含重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。如同上述替卡格雷一樣，維持劑量的噻氯匹定可以與75-100 mg的阿司匹林日劑量一起投與。

【0075】 通常在口服投與後2小時左右觀察到噻氯匹定的血漿峰值水平。單劑量後之半衰期範圍為7至13小時。重複給藥後之半衰期為約4至5天。

【0076】 P2Y₁₂-受體抑制劑可以是坎格雷洛。坎格雷洛可以以推注形式，以連續輸注形式或以推注隨後連續輸注的形式靜脈內投與。在一些實施方式中，坎格雷洛以30 µg/kg靜脈推注的形式投與，隨後立即以每分鐘4 µg/kg靜脈輸注的形式投與。

【0077】 坎格雷洛在開始輸注30分鐘內迅速達到穩態血漿水平和血小板凝集抑制作用，並且血漿半衰期短，大約小於9分鐘。在15分鐘內達到最大的血小板抑制作用。坎格雷洛的消除半衰期為約3-6分鐘，並且血小板反應通常在停藥15分鐘內恢復到基線。

治療與投與

【0078】 本文描述的使用之方法和產品用於治療患者（例如人類患者）中的缺血性事件，缺血性事件包括其中供血限於患者身體的特定部分（例如患者的心臟或腦部），其中該限制可能是由血凝塊（血栓）引起的疾病和病症。心臟缺血性事件包括急性冠狀動脈症候群。腦部缺血性事件稱為急性腦血管事件，並且包括急性缺血性卒中（AIS）和短暫性缺血性發作（TIA）。急性冠狀動脈症候群包括分類為ST段抬高型心肌梗塞（STEMI）或非ST段抬高型心肌梗塞（NSTEMI）的心肌梗塞，及不穩定型心絞痛。在較佳的實施方式中，治療係對患者中ST段抬高型心肌梗塞（STEMI）的治療。

【0079】 心肌梗塞在臨床上通常分類為STEMI和NSTEMI。該等基於心電圖（ECG）的變化並且可以由醫師或其他熟練的醫務人員進行診斷。心肌梗塞的類型可以根據Thygesen等人2018年提出的心肌梗塞通用定義進行定義或從該通用定義得出。

【0080】 在本文所述之治療方法中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同P2Y₁₂抑制劑一起投與。在該上下文中，術語「連同」的使用旨在意指在投與後（例如30分鐘內，或1小時內，或2小時內，或3小時內），P2Y₁₂抑制劑（和/或其代謝物）與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白兩者在患者血流中均可生物利用。在動物模型中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白AZD3366的投與在5分鐘內產生顯著的酶活性，包括抗血小板作用（取決於劑量），並且3至4週不會恢復到基線（取決於劑量），而P2Y₁₂抑制劑通常在投與後需要更長時間才變得有活性。例如，通常直到一個劑量後2小時左右才觀察到替卡格雷的最大活性，並且這維持超過8小時。

【0081】 因此，為了重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同P2Y₁₂抑制劑一起投與，不一定總是同時物理投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑。相反，可以先投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑中的一種，稍後（例

如一小時或更長時間後)再投與另一種藥劑，條件係在投與後，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑兩者在患者的血流中均生物可利用。

【0082】此外，一些表現出缺血性事件的患者可能已經在定期投與P2Y₁₂抑制劑，例如作為先前缺血性事件後維持劑量的一部分。此類患者在本文中稱為「目前正在接受P2Y₁₂抑制劑治療」。例如，通常每天兩次，作為維持劑量的一部分，投與90 mg劑量的替卡格雷。在根據本文之方法投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的此類患者中，由於認為P2Y₁₂抑制劑（和/或其代謝物）在患者血流中仍具有生物活性，因此不一定總是需要投與另一劑量的抑制劑。替代性地，可以投與比P2Y₁₂抑制劑的正常負荷劑量減少的劑量，以便使血流中生物活性P2Y₁₂抑制劑的水平達到最高。例如在替卡格雷的情況下，如果替卡格雷在患者血流中仍具有生物活性，則可以投與60 mg或90 mg或150 mg的劑量，與180 mg的典型負荷劑量完全不同。有效劑量可以由熟練的醫師或其他熟練的醫務人員確定。然而，較佳的是，即使患者目前正在接受P2Y₁₂抑制劑治療，該方法仍然包括向患者投與P2Y₁₂抑制劑（例如負荷劑量）。

【0083】如果最後一個劑量的抑制劑係在與P2Y₁₂抑制劑的平均消除半衰期相對應，超過P2Y₁₂抑制劑的平均消除半衰期的兩倍，或超過P2Y₁₂抑制劑的平均消除半衰期的三倍，或超過P2Y₁₂抑制劑的平均消除半衰期的五倍，或約10天的時間段內投與的，則仍然可以認為P2Y₁₂抑制劑在患者的血流中具有生物活性。例如，在替卡格雷的情況下，替卡格雷的平均消除半衰期為7小時，其活性代謝物的平均消除半衰期為9小時。因此，如果最後一個劑量係在最近9小時內、最近18小時內、最近27小時內、最近36小時內、或最近45小時內，則可以認為替卡格雷在患者的血流中具有生物活性。替代性地，可以認為P2Y₁₂抑制劑在血流中具有生物活性，直到在停止給藥後活性恢復到基線為止，在替卡格雷的情況下是在5天後）。

【0084】 其他表現出缺血性事件的患者可能先前尚未投與過P2Y₁₂抑制劑，或者可能已停止先前的P2Y₁₂抑制劑投與，例如以致不再認為P2Y₁₂抑制劑在患者血流中具有生物活性。該等患者可以稱為「原初」患者。在原初患者中，為了連同P2Y₁₂抑制劑一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，該方法必須包括向患者投與P2Y₁₂抑制劑的步驟。

【0085】 重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑可以以組合配製物的形式，例如經由靜脈注射投與。替代性地，向患者投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑可以是同時的或依次。如本文所用，同時投與係指基本上在同一時間（例如在彼此的10分鐘內、5分鐘內或1分鐘內），視需要經由不同的投與途徑向患者投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑兩者。例如，將在藉由口服投與提供P2Y₁₂抑制劑的1分鐘內靜脈注射重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白認為係同時投與。

【0086】 在使用依次投與時，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑較佳的是在彼此的24小時、18小時、12小時、6小時、2小時、1小時內或更較佳的是在30分鐘內投與。在一些實施方式中，先投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，然後依次投與P2Y₁₂抑制劑。在其他實施方式中，先投與P2Y₁₂抑制劑，然後依次投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【0087】 在一些實施方式中，在缺血性事件（例如急性冠狀動脈症候群諸如STEMI）發作後24小時或更短時間，或18小時或更短時間，或12小時或更短時間，或6小時或更短時間，或4小時或更短時間，或2小時或更短時間，或1小時或更短時間，或甚至30分鐘或更短時間連同P2Y₁₂抑制劑一起向患者投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。本文所指的缺血性事件的發作可以是在缺血性事件的一種或多種症狀（例如在STEMI的情況下是胸痛）的發作時間或在診斷（例如在急

性冠狀動脈症候群的情況下經由心電圖診斷)時，診斷可以在患者到達醫院治療之前或之後不久進行。

【0088】較佳的是，在對患有急性冠狀動脈症候群或AIS的患者進行手術或非手術再灌注治療(例如經皮冠狀動脈介入治療(PCI)、血栓切除術或溶血栓治療)之前，連同P2Y₁₂抑制劑一起向患者投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【0089】PCI可以包括但不限於氣囊血管成形術、支架植入、旋轉或激光斑塊切除術和/或近距離放射治療。在植入支架的情況下，支架可以是但不限於本領域已知的裸金屬支架、藥物洗脫支架、可吸收支架等。

【0090】重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑的組合對心臟和腦組織提供的保護作用可用於預防和/或減輕歸因於再灌注治療後循環恢復而引起的組織損傷或功能損傷。因此，在一些實施方式中，該方法進一步包括在投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白後少於48小時、少於24小時、少於12小時、少於6小時，對患者進行手術或非手術再灌注治療(例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療)。在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑均在進行手術或非手術再灌注治療(例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療)之前投與於患者。在其他實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白在進行手術或非手術再灌注治療(例如PCI)之前投與於患者，而P2Y₁₂抑制劑在進行手術再灌注治療之後不久，例如6小時內、4小時內、2小時內、或1小時內投與。在一些實施方式中，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑在手術或非手術再灌注治療(例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療)期間在患者的血流中保持生物可利用。

【0091】本揭露包括其中組合了上述關於以下各項的時間安排中的任一種的實施方式：i) 同時或依次投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑的時間安排；ii) 與缺血性事件發作有關的投與的時間安排；以及iii) 與手術或非手術再灌注治療(例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療)有關的投與的時間安排。

例如，該方法可以包括在缺血性事件發作的6小時內投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，其中該方法進一步包括在少於12小時、或少於6小時內對患有進行手術或非手術再灌注治療（例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療），並且其中在投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的6個小時內向患者投與P2Y₁₂抑制劑，視需要其中在進行手術或非手術再灌注治療（例如PCI、血栓切除術或溶血栓治療）之前向患者投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑兩者。

【0092】 本文所述之任何方法可以進一步包括向患者投與阿司匹林。阿司匹林通常以與P2Y₁₂抑制劑和重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白分開的單獨配製物的形式投與，並且與P2Y₁₂抑制劑和重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白中的任何一種或兩者同時或依次投與。在一些實施方式中，阿司匹林在投與P2Y₁₂抑制劑的24小時、18小時、12小時、6小時、2小時、1小時內或更較佳的是在30分鐘內投與。在一些實施方式中，阿司匹林在投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的24小時、18小時、12小時、6小時、2小時、1小時內或更較佳的是在30分鐘內投與。在一些實施方式中，阿司匹林與P2Y₁₂抑制劑或重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白同時投與。在一些實施方式中，在缺血性事件（例如急性冠狀動脈症候群（諸如STEMI）、AIS或TIA）發作後24小時或更短時間，或18小時或更短時間，或12小時或更短時間，或6小時或更短時間，或4小時或更短時間，或2小時或更短時間，或1小時或更短時間，或甚至30分鐘或更短時間連同P2Y₁₂抑制劑一起向患者投與阿司匹林。

【0093】 阿司匹林可以以50 mg至325 mg（例如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或350 mg）的劑量投與於患者。在一些實施方式中，阿司匹林以50 mg至200 mg，或100 mg至200 mg（例如162 mg）的劑量投與於患者。在一些實施方式中，阿司匹林以200 mg至350 mg，或250 mg至325 mg（例如300 mg或325 mg）

的劑量投與於患者。在一些實施方式中，阿司匹林以75 mg至150 mg或75 mg至100 mg的劑量投與於患者。

【0094】如本文在治療病狀的上下文中所用，術語「治療」通常涉及人類的治療和療法，其中實現了一些期望的治療效果，例如，抑制病狀的進展，並且包括進展速率的降低、進展速率的停止、病狀的消退、病狀的改善和病狀的治癒。還包括作為預防措施的治療（即預防、防止）。

【0095】可以藉由例如推注、靜脈內、肌肉內、皮下、吸入、連續輸注、持續釋放或其他藥學上可接受的技術來給予本文所述之重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的投與。理想地，重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白將以含有生理上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑的藥學上可接受的形式投與於患者。此類稀釋劑和賦形劑可以由中性緩衝鹽水溶液、抗氧化劑（例如抗壞血酸）、低分子量多肽（例如<10個胺基酸的多肽）胺基酸、碳水化合物（例如葡萄糖、右旋糖、蔗糖或右旋糖酐）、螯合劑（諸如EDTA）、穩定劑（諸如麩胱甘肽）組成。另外，為了酶的最大活性，可以在給藥時投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的共底物，例如鈣（ Ca^{2+} ）。選擇此類載體和稀釋劑以在推薦的劑量和濃度下對患者無毒。

【0096】本文所述之 P2Y_{12} 抑制劑的投與將取決於所用的特定 P2Y_{12} 抑制劑。例如，替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定和普拉格雷通常以藥學上可接受的口服劑型投與於患者，而坎格雷洛通常經由靜脈注射投與於患者。

【0097】重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的劑量要求可根據年齡、種族、體重、身高、性別、治療持續時間、投與方法、重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白的生物活性以及病狀嚴重程度或其他臨床變數而有顯著差異。有效劑量可以由熟練的醫師或其他熟練的醫務人員確定。

【0098】該方法可以包括連同合適劑量（例如負荷劑量）的 P2Y_{12} 抑制劑和視需要阿司匹林（如果存在）一起，以單個有效劑量的形式投與重組腺苷三磷酸

雙磷酸酶蛋白。雖然通常僅使用單個有效劑量的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶，但該方法可以進一步包括週期性地並且在負荷劑量之後，作為長期治療或維持治療的一部分，投與一個或多個口服劑量的P2Y₁₂抑制劑。例如，P2Y₁₂抑制劑可以例如在初始負荷劑量之後，例如以上述維持劑量每天投與一次或兩次，持續數週、數月或甚至數年。如本領域中已知的，維持劑量的P2Y₁₂抑制劑可以與阿司匹林一起投與。缺血性事件後P2Y₁₂抑制劑的長期治療或維持治療係本領域已知的，並且適當的劑量和時間安排可以由熟練的醫師或其他熟練的醫務人員確定。

【0099】 重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白可以作為包含重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和藥學上可接受的載體或稀釋劑的藥物組成物投與。P2Y₁₂抑制劑可以作為包含P2Y₁₂抑制劑和藥學上可接受的載體或稀釋劑的藥物組成物投與。

【0100】 如本文所用，術語「藥學上可接受的」涉及化合物、成分、材料、組成物、劑型等，其在合理的醫學判斷範圍內適合與討論的受試者（例如人）的組織接觸使用，沒有過度的毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症，與合理的受益/風險比相稱。在與配製物的其他成分相容的意義上，每種載體、稀釋劑、賦形劑等也必須是「可接受的」。

【0101】 以其特定形式或根據用於執行所揭露的功能的方式、或者用於獲得所揭露的結果之方法或過程來表現的在前面的說明書或在以下申請專利範圍或在附圖中揭露的特徵，視情況可以單獨地，或者以此類特徵的任何組合的方式用於以其各種形式來實現本發明。

【0102】 雖然已經連同上述示例性實施方式一起描述了本發明，但是當給出本揭露時，許多等同修改和變化對於熟悉該項技術者將是顯而易見的。因此，認為以上闡述的本發明之示例性實施方式係說明性的而不是限制性的。在不脫離本發明之精神和範圍的情況下，可以對所描述的實施方式進行各種改變。

【0103】 為了避免任何疑問，提供本文提供的任何理論解釋係為了提高讀者的理解。諸位發明人不希望受到任何該等理論解釋的束縛。

【0104】 本文使用的任何章節標題只是出於組織的目的，而不應被解釋為限制所描述的主題。

【0105】 除非上下文另有要求，否則在本說明書（包括後面的申請專利範圍）全篇，詞語「包含」和「包括」及變型應當被理解為暗指包括所陳述的整數或步驟或者多個整數或步驟的組，但不排除任何其他整數或步驟或者多個整數或步驟的組。

【0106】 必須指出的是，如本說明書和所附申請專利範圍中所用，除非上下文另外明確指出，否則單數形式「一」、「一種（個）」和「該」包括複數指示物。本文可以將範圍表述為「約」一個特定值，和/或至「約」另一個特定值。在表述此類範圍時，另一個實施方式包括從該一個特定值開始和/或到另一個特定值。類似地，藉由使用先行詞「約」將值表述為近似值時，應該理解該特定值形成了另一個實施方式。相對於數值的術語「約」係視需要的並且意指例如 $\pm 10\%$ 。

實例

實例1 - 用於在豬中進行的實驗的材料和方法

實驗設計

【0107】 將常規食物餵養的長白豬（ $n = 20$ ；重量 ≈ 40 kg）隨機（Excel隨機函數）分成四組以接受：

- I) 口服安慰劑對照（心肌梗塞（MI）誘導前2小時， $n = 5$ ）
- II) 負荷劑量的替卡格雷（180 mg； $n = 5$ ；MI誘導前2小時口服）

III) 負荷劑量的替卡格雷 (180 mg ; n = 5 ; MI誘導前2小時口服和再灌注前10分鐘靜脈注射1 mg/kg AZD3366)

IV) 負荷劑量的替卡格雷 (180 mg ; n = 5 ; MI誘導前2小時口服和再灌注前10分鐘靜脈注射3 mg/kg AZD3366)

【0108】此後，豬接受冠狀動脈左中前降支（實驗MI）的暫時性（90分鐘）球囊阻斷，然後再灌注，基本上如Vilahur等人2016所述。在接下來的42天內，豬每天接受安慰劑（I組）或替卡格雷（90 mg/每天兩次，II至IV組）的口服維持給藥，並在MI後的第3天（早期重塑階段）和第42天（晚期重塑階段）進行連續心臟磁共振（CMR）評估。

【0109】在圖1中示意性地說明了該實驗設計。

MI的實驗誘導

【0110】在MI誘導的當天，動物接受丁丙諾啡（buprenorphine）（0.03 mg/kg）和頭孢唑啉（25 mg/kg）分別作為對疼痛和傷口感染的預防，然後藉由投與氯胺酮（ketamine）（30 mg/kg）、甲苯噻吡（xylazine）（2.2 mg/kg）和阿托品（atropine）（0.05 mg/kg）的肌肉內注射進行麻醉。一旦鎮靜下來，就對動物進行氣管內插管，並藉由異氟烷吸入（2%）維持麻醉。在開始MI誘導程序之前，開始通過置於耳邊緣靜脈中的管線輸注在1.000 mL鹽水（250 mL/h）中的胺碘酮（amiodarone）（300 mg）和利多卡因（lidocaine）（150 mg），作為對惡性室性心律不整的預防，並且投與肝素推注（100 U/kg）以防止導管中形成凝塊。如先前在Vilahur等人2016中所述，實驗上藉由冠狀動脈左前降支中部的微創閉合性胸心肌球囊阻斷來誘導MI。完全冠狀動脈缺血（藉由血管造影術證實）維持90分鐘。在缺血期結束時，球囊完全放氣，使動物恢復。在整個程序中連續記錄心電圖（ECG）和血液動力學參數，並且在MI誘導前後使用配備有S5-1扇形陣

列換能器的超音波心動圖系統（Phillips iE33）記錄左心室射血分數的初始惡化（LVEF，使用胸骨旁長軸視圖的M模式分析；Vilahur等人2016）。

3T-CMR採集與分析：整體和區域性結構及功能分析

【0111】在MI後第3天（早期重塑階段）和第42天（晚期重塑階段）連續地在所有動物中進行CMR研究。在3.0T-CMR系統（AchievaVR，荷蘭阿姆斯特丹的飛利浦公司（Philips, Amsterdam, The Netherlands）P）上進行研究，並且由對治療不知情的CMR專業技術人員進行CMR圖像採集。對於CMR研究，藉由肌肉注射由氯胺酮、甲苯噻吡和阿托品組成的混合物對動物進行麻醉，並藉由連續靜脈輸注異丙酚維持以確保機械通氣。一旦將動物處於頭朝上的仰臥位，並在胸部上方放置了柔性相控陣表面線圈，就可以使用ECG閘控來獲取心臟的靜態圖像。在所有情況下均獲取以下專用CMR序列：「電影」（cine）平衡穩態自由進動（Balanced Steady-State Free Precession，bSSFP）成像序列，用於評估室壁運動（WM）和心臟功能；T2加權短tau反轉恢復（T2w-STIR）序列，用於評估心肌水腫；早期釷增強，用於研究微血管阻塞（無復流現象）；和晚期釷增強（LGE），用於評估心肌壞死的量和程度。所有CMR研究都遵循相同的方案。首先，獲得偵察圖像[T1超快速場回波（turbo field echo，TFE）序列]以定位心臟的真實軸並限定涉及整個心臟的視野。之後，在水平和垂直長軸（四腔觀和二腔觀）以及覆蓋整個左心室（LV）的多個連續短軸圖像中進行bSSFP電影成像。在短軸電影序列中，我們獲取每個切片的24個心臟相位，以確保對WM和心臟功能的正確評價。一旦獲得了電影序列，就獲得了T2w-STIR序列以評估心肌水腫。此後，以0.1 mmol/kg的劑量靜脈注射基於釷的造影劑（Gd-GTPA，MagnevistVR，美國新澤西州韋恩的伯萊克斯實驗室公司（Berlex Laboratories Inc., Wayne, NJ, USA））。投與造影劑後1分鐘，獲取早期釷增強序列。投與造影劑後10分鐘獲得LGE序列。

CMR序列的技術參數的詳細資訊以及整體和區域性功能/解剖學參數的分析方案先前已公開（Vilahur等人2016）。

實例2 - 在豬心肌梗塞模型中AZD3366和替卡格雷對心臟損傷、功能和出血的影響

【0112】 進行實驗以檢查投與重組可溶性形式的ADP酶AZD3366（也稱為APT102）是否在減少梗塞面積和改善心臟功能方面與單獨的替卡格雷相比賦予另外的益處。方法和分析如實例1所述進行。

心臟損傷評估

【0113】 下表提供了豬模型中心臟損傷評估實驗的結果：

MI後3天藉由CMR評估的心臟損傷				
	安慰劑	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
LV質量	70.0 ± 4.1	81.3 ± 7.4	75.0 ± 3.6	76.5 ± 2.2
水腫（gr）	20.4 ± 1.7	10.5 ± 0.8*	7.3 ± 1.7*	6.4 ± 0.8*†
水腫占LV質量的%	29.8 ± 1.9	13.1 ± 0.9*	9.8 ± 2.3*	8.4 ± 0.9*†
壞死（gr）	12.2 ± 1.5	6.6 ± 1.0*	5.2 ± 0.7*	3.2 ± 0.9*†
壞死占LV質量的%	7.7 ± 1.5	8.2 ± 1.2*	7.0 ± 0.9*	4.2 ± 1.2*†

*與安慰劑相比 $p < 0.05$ ；†與所有其他變數相比， $p < 0.05$

MI後42天藉由CMR評估的心臟損傷				
	安慰劑	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
LV質量	100.6 ± 3.6	108.6 ± 6.9	107 ± 6.7	111.7 ± 9.4
壞死（gr）	7.9 ± 0.9	4.7 ± 1.0*	4.5 ± 1.7*	3.4 ± 1.2*†
壞死占LV質量的%	7.8 ± 0.7	4.3 ± 0.8*	4.1 ± 1.5*	2.8 ± 1.0*†

*與安慰劑相比 $p < 0.05$ ；†與所有其他變數相比， $p < 0.05$

【0114】 與單獨的替卡格雷相比，替卡格雷 + 3 mg/kg AZD 3366的壞死面積進一步減小，並且替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366的壞死面積數值較低證明該組合具有劑量依賴性增強的心臟保護作用。由於該模型係人類疾病的最佳臨床前模型，因此這係可以表明在人類中的治療作用的最有力的證據。

心臟功能評估

【0115】 下表提供了豬模型中心臟功能評估實驗的結果：

藉由CMR評估的整體和區域性心臟功能					
	時間	安慰劑	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
LVEF%	BSL	58.7 ± 2.1	53.7 ± 2.8	55.4 ± 1.4	52.8 ± 2.2
	3天	48.6 ± 2.0*	50.3 ± 2.9	46.4 ± 2.0	52.0 ± 3.5
	42天	46.2 ± 3.0*	47.0 ± 4.4	46.6 ± 5.5	54.8 ± 3.8

*與BSL（基線）相比 $p < 0.05$

藉由CMR評估的整體和區域性心臟功能					
	時間	安慰劑	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
室壁運動 (mm)	BSL	2.81	2.66	2.63	2.75
	3天	1.11	1.88	1.73	2.68*
	42天	1.82	2.55	2.64	3.09*

*與所有其他變數相比， $p < 0.05$

【0116】 與單獨的替卡格雷相比，替卡格雷 + 3 mg/kg AZD 3366的室壁運動評分進一步提高，證明心肌梗塞後心臟功能的治癒和恢復增強。同時發生梗塞面積減小和功能改善將急性心臟保護作用模式與心臟功能恢復改善聯繫在一起。由於該模型係人類疾病的最佳臨床前模型，因此這係可以表明在人類中的治療作用的最有力的證據。

實例3 - AZD3366和替卡格雷對小鼠尾出血的影響

【0117】 這項研究的目的是評價AZD3366單獨或與替卡格雷組合在小鼠體內的出血風險和血小板凝集抑制作用。

實驗方案

【0118】 向C57Bl6小鼠投與AZD3366或媒介物的靜脈推注。在單獨的組中，以推注和連續輸注替卡格雷的形式向小鼠投與AZD3366和替卡格雷或僅替卡格雷。下表描述了分組、投與的劑量和體積：

分組	治療	劑量		體積	
		推注 (mg/kg)	輸注 (µg/kg*min)	推注 (mL/kg)	輸注 (µL/kg*min)
媒介物 (V)	5%甘露醇 + 緩衝液	NA	NA	1.0 + 1.0	200 + NA
替卡格雷 (T)	替卡格雷 + 緩衝液	1.2 + NA	30 + NA	1.0 + 1.0	200 + NA
AZD3366 (AZD1)	5%甘露醇 + AZD3366	NA + 1.0	NA + NA	1.0 + 1.0	200 + NA
AZD3366 (AZD3)	5%甘露醇 + AZD3366	NA + 3.0	NA + NA	1.0 + 1.0	200 + NA
替卡格雷 + AZD3366 (T + AZD1)	替卡格雷 + AZD3366	1.2 + 1.0	30 + NA	1.0 + 1.0	200 + NA

緩衝液 = 20 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl，pH 7.4。NA；不適用。每個研究組中包括十二隻動物。

【0119】 在t = 20分鐘時，進行尾部橫切，並記錄60 min的失血量和BT。在實驗結束即t = 80 min時，收集腹主動脈的血樣用於血小板凝集評估以及後續的AZD3366和替卡格雷血漿濃度分析。

出血模型

【0120】給藥後二十分鐘，切割尾部5 mm尖端引起出血。用水沖洗尾部，並將其置於血紅蛋白敏感裝置中。記錄通過血液和水的混合物的光透射，並使用PharmLab軟體（V6.0，瑞典哥德堡的阿斯利康研發中心（AstraZeneca R & D, Gothenburg, Sweden））將其轉換為吸光度。將低於95%的透射率定義為出血。從切割尾部開始的60分鐘內測量總失血量（出血曲線下面積， $t = 20 \text{ min}$ 至 $t = 80 \text{ min}$ ：累積失血量與時間，吸光度*s，abs*s）和出血時間（BT）。

血液和血漿分析

【0121】將來自腹主動脈的血樣收集在帶有Terumo® Neolus 27G、0.4 x 20 mm針頭（比利時魯汶的泰爾茂歐洲分公司（Terumo Europe N.V., Leuven Belgium））的Omnifix®-F 1 mL注射器（德國埃門的布朗醫療公司（Braun Medical AG, Emmenbrücke, Germany））中。使用來匹盧定（lepirudin）（Refludan®拜耳醫療保健製藥公司（Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc））作為抗凝劑，將10 μL 、5 mg/mL添加到最多1 mL血液中，得到7 $\mu\text{mol/L}$ 的最終血液濃度。將全血用於使用Multiplate®阻抗凝集計測量血小板凝集。藉由以10000*g離心5 min（丹麥哈威德夫的奧列迪克公司（Ole Dich, Hvidovre, Denmark））從剩餘的血液中製備血漿。將血漿轉移到新的試管中，並儲存在-20°C下，用於稍後分析替卡格雷和AZD3366的總血漿濃度。

【0122】取血樣後立即將175 μL 全血添加到Multiplate®（德國曼海姆的羅氏診斷有限公司（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany））小型試驗單元中，並與175 μL 37°C預熱鹽水（9 mg/mL，德國巴特洪堡的費森尤斯卡比有限公司（Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany））混合。3 min後，添加12 μL 二磷酸腺苷（ADP，德國曼海姆的羅氏診斷有限公司）達到6.5 $\mu\text{mol/L}$ 的最終測

定濃度。測量反應6 min並將數據表示為隨時間 (AU*min) 記錄的凝集單位 (AU) 的平均曲線下面積 (AUC) 。

【0123】 借助於液相層析-質譜 (LC-MS/MS) 法測定替卡格雷的血漿濃度。

【0124】 藉由ELISA測定AZD3366的血漿濃度，涉及用包被在96孔板上的小鼠抗AZD3366單株抗體 (mAb2567，美國新澤西州普林斯頓的科文斯公司 (Covance, Princeton, NJ, USA)) 捕獲AZD3366，並用辣根過氧化物酶偶聯的兔抗AZD3366多株抗體 (pAb3939-HRP，科文斯公司 (Covance))，使用TMB作為底物來監測結合的AZD3366。

結果

【0125】 失血量和BT的結果呈現於下表中，並在圖2中進行了說明。

失血量和出血時間 (BT)				
分組	失血量 (abs*s)		BT (s)	
	中值	範圍 (最低-最高)	中值	範圍 (最低-最高)
媒介物	160	28-778	655	66-2734
替卡格雷	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
替卡格雷 + AZD3366 1.0 mg/kg	961	176-1464	2657	930-3585

n = 12隻/研究組。失血量 (abs*s) 和出血時間 (BT, s)。出血量係在切割尾部尖端後的60分鐘內測量的。替卡格雷，1.2 mg/kg推注，然後是30 µg/kg*min作為維持輸注；AZD3366，1.0 mg/kg或3.0 mg/kg推注。

- a 與媒介物相比，p < 0.001
- b 與AZD3366 1.0 mg/kg相比p < 0.01

- c 與AZD3366 3.0 mg/kg相比 $p < 0.001$
- d 與AZD3366 3.0 mg/kg相比 $p < 0.05$
- e 與替卡格雷 + AZD3366相比， $p < 0.05$ 。

【0126】 與接受媒介物的動物相比，經替卡格雷治療的動物的失血量和BT分別增加7.2倍 ($p < 0.001$) 和5.2倍 ($p < 0.001$)。相比之下，以1 mg/kg或3 mg/kg的AZD3366治療與失血量或BT與媒介物相比的統計學顯著增加不相關。此外，與在僅投與替卡格雷的動物組中所見到的相比，替卡格雷和AZD3366組合組的失血量和BT並無差異。

【0127】 血小板凝集 (PA) 結果列於下表：

小鼠中AZD3366 (AZD) 和替卡格雷 (T) 的血小板凝集抑制作用和血漿濃度			
分組	PA (AU*min)	T (μmol/L)	AZD (μg/mL)
媒介物	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

【0128】 因此，與替卡格雷 (T) 形成對比，AZD3366 (1 mg/kg和3 mg/kg) 完全抑制血小板凝集 (PA) 與出血量增加不相關 (圖2)。另外，AZD3366和替卡格雷的組合給藥並未使出血量增加高於單獨的替卡格雷所見的出血量。

【0129】 該實驗的結果證明，替卡格雷和AZD3366的組合不會使出血量增加高於單獨的替卡格雷所見的出血量。

參考文獻

【0130】 上面引用了許多出版物以便更全面地描述和揭露本發明以及本發明所屬領域之技術水平。下面提供了該等參考文獻的完整引用。該等參考文獻中的每一篇參考文獻整體併入本文。

【0131】 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)

【0132】 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., Widimský, 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>

【0133】 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).

【0134】 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).

【0135】 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.0000000000000211>

【0136】 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>.

【0137】 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>.

【0138】 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>

【0139】 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>

【0140】 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>.

【0141】 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>

【0142】 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.

【0143】 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>

【0144】 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>

【0145】 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.

【0146】 Wallentin, L., Becker, R. C., Budaj, A., Cannon, C.P., Emanuelsson, H., Held, C., Horrow, 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., & Thorsén, 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>

【0147】 For standard molecular biology techniques, see Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*.3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

序列

識別符	描述	序列
SEQ ID NO: 1	人CD39L3胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1的胺基酸殘基49-485加底線)	MVTVLTRQPC EQAGLKALYRTPTIIALVVLLVSIVVLVSITVIQIHK QEVLP PGLKYGIVLDAGSSRTTVYVYQWPAEKENNTGVVSQTFKCSV KSGSISSYGNNPQDVPRAFE ECMQKVKGQVP SHLHGSTPIHLGATAG MRLRLQNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIIISGQEEGVYGWI TANYLMGNFLEKNLWHMWVHPHGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKM DLNTSDIMQVSLYGYVYTLYTHSFQCYGRNEAEKKFLAMLLQNSPTK NHLTNPCYPRDYSISFTMGHVFD SLCTVDQRPESYNPN DVITFEGTG DPSLC KEKVASIFDFKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPFVAFAGFYT ASALNLSGSFSLDTFNSSTWNFCSQNWSQLPLLLPKFDEVYARSYCF SANYIYHLFVNGYKFTEETWPQIHFEKEVGNSSIAWSLG YMLSLTNQ IPAESPLIRLP IEPFVFGTLAFFTAAALLCLAFLAYLCSATRRKRH SEHAFDHA VDSD
SEQ ID NO: 2	AZD3366胺基酸序列 (N端EVL P加下劃線，R67G和T69R胺基酸取代為粗體加底線)	EVL P PGLKYGIVLDAGSS GR VYVYQWPAEKENNTGVVSQTFKCSVK GSGISSYGNNPQDVPRAFE ECMQKVKGQVP SHLHGSTPIHLGATAGM RLLRLQNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIIISGQEEGVYGWIT ANYLMGNFLEKNLWHMWVHPHGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKMD LNTSDIMQVSLYGYVYTLYTHSFQCYGRNEAEKKFLAMLLQNSPTKN HLTNPCYPRDYSISFTMGHVFD SLCTVDQRPESYNPN DVITFEGTG PSLC KEKVASIFDFKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPFVAFAGFYTA SALNLSGSFSLDTFNSSTWNFCSQNWSQLPLLLPKFDEVYARSYCF ANYIYHLFVNGYKFTEETWPQIHFEKEVGNSSIAWSLG YMLSLTNQ IPAESPLIRLP IEPFV

【符號說明】

【0148】 無

【生物材料寄存】

【0149】 無

【序列表】

<110> 阿斯利康制药有限公司（AstraZeneca AB）

<120> 組合治療

<130> 201079

<150> US 63/067,338

<151> 2020-09-19

<160> 2

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 529

<212> PRT

<213> 人（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 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> 人二 時:列

<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 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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療患者中的缺血性事件之方法，該方法包括連同P2Y₁₂抑制劑一起投與重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【請求項2】一種在治療患者中的缺血性事件之方法中使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，該方法包括向該患者投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，其中該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同P2Y₁₂抑制劑一起投與。

【請求項3】一種在治療患者中的缺血性事件之方法中使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制劑，該方法包括將該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同該P2Y₁₂抑制劑一起投與於該患者。

【請求項4】一種在治療患者中的缺血性事件之方法中使用的P2Y₁₂抑制劑，該方法包括向該患者投與該P2Y₁₂抑制劑，其中該P2Y₁₂抑制劑連同重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白一起投與。

【請求項5】如請求項1所述之方法，或如請求項2至4中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該方法包括向該患者同時投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和該P2Y₁₂抑制劑，或視需要在同一天向該患者依次投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和該P2Y₁₂抑制劑。

【請求項6】如請求項5所述之方法，或如請求項5所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該方法包括

- a. 向該患者投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白，接著依次投與該P2Y₁₂抑制劑；或
- b. 向該患者投與該P2Y₁₂抑制劑，接著依次投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【請求項7】如請求項1、5或6中任一項所述之方法，或如請求項2-6中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中在向該患者投與該P2Y₁₂抑制劑的24小時內或12小時內向該患者投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白。

【請求項8】如請求項1和5至7中任一項所述之方法，或如請求項2至7中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該方法進一步包括在連同該P2Y₁₂抑制劑一起投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白之後至少24小時開始向該患者至少每天投與該P2Y₁₂抑制劑，視需要其中該等每天投與持續至少1個月、至少2個月、或至少6個月。

【請求項9】如請求項1和5至8中任一項所述之方法，或如請求項2至8中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該P2Y₁₂抑制劑選自由以下組成的列表：替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定、普拉格雷和坎格雷洛。

【請求項10】如請求項9所述之方法，或如請求項9所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該P2Y₁₂抑制劑為替卡格雷。

【請求項11】如請求項1和5至10中任一項所述之方法，或如請求項2至10中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白係可溶性CD39L3蛋白，其包含與SEQ ID NO: 1的位置49-485至少80%相同的胺基酸序列。

【請求項12】如請求項11所述之方法，或如請求項11所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中與具有在SEQ ID NO: 1的位置49-485中列出的胺基酸序列的參考CD39L3蛋白相比，該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含一個或多個修飾，其中該修飾產生與該參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比增強

的ADP酶活性，或者其中所述修飾產生與該參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相同的ADP酶活性以及與該參考腺苷三磷酸雙磷酸酶相比降低的ATP酶活性。

【請求項13】如請求項12所述之方法，或如請求項12所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中與該參考CD39L3蛋白相比，該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白在位置67和69處包含取代，其中該等位置係根據SEQ ID NO: 1編號的。

【請求項14】如請求項13所述之方法，或如請求項13所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中位置67處的該取代係取代為甘胺酸而位置69處的該取代係取代為精胺酸。

【請求項15】如請求項1和5至14中任一項所述之方法，或如請求項2至14中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白包含如SEQ ID NO: 2列出的胺基酸序列。

【請求項16】如請求項1和5至15中任一項所述之方法，或如請求項2至15中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白以10 mg至1000 mg的劑量投與。

【請求項17】如請求項1和5至16中任一項所述之方法，或如請求項2至16中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中：

- a. 該P2Y₁₂抑制劑為替卡格雷並且以60 mg至200 mg，視需要180 mg的劑量投與；
- b. 該P2Y₁₂抑制劑為氯吡格雷並且以75 mg至600 mg，視需要300 mg或600 mg的劑量投與；
- c. 該P2Y₁₂抑制劑為噻氯匹定並且以250 mg至500 mg，視需要500 mg的劑量投與；

d. 該P2Y₁₂抑制劑為普拉格雷並且以5 mg至60 mg，視需要60 mg的劑量投與；或

e. 該P2Y₁₂抑制劑為坎格雷洛並且以30 µg/kg靜脈推注的劑量投與，然後以每分鐘4 µg/kg靜脈輸注的劑量投與。

【請求項18】 如請求項1和5至17中任一項所述之方法，或如請求項2至17中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該方法進一步包括向該患者投與阿司匹林，視需要其中該阿司匹林以50 mg至325 mg投與。

【請求項19】 如請求項1和5至18中任一項所述之方法，或如請求項2至18中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該缺血性事件係急性缺血性卒中或短暫缺血性發作。

【請求項20】 如請求項1和5至18中任一項所述之方法，或如請求項2至18中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該缺血性事件係急性冠狀動脈症候群。

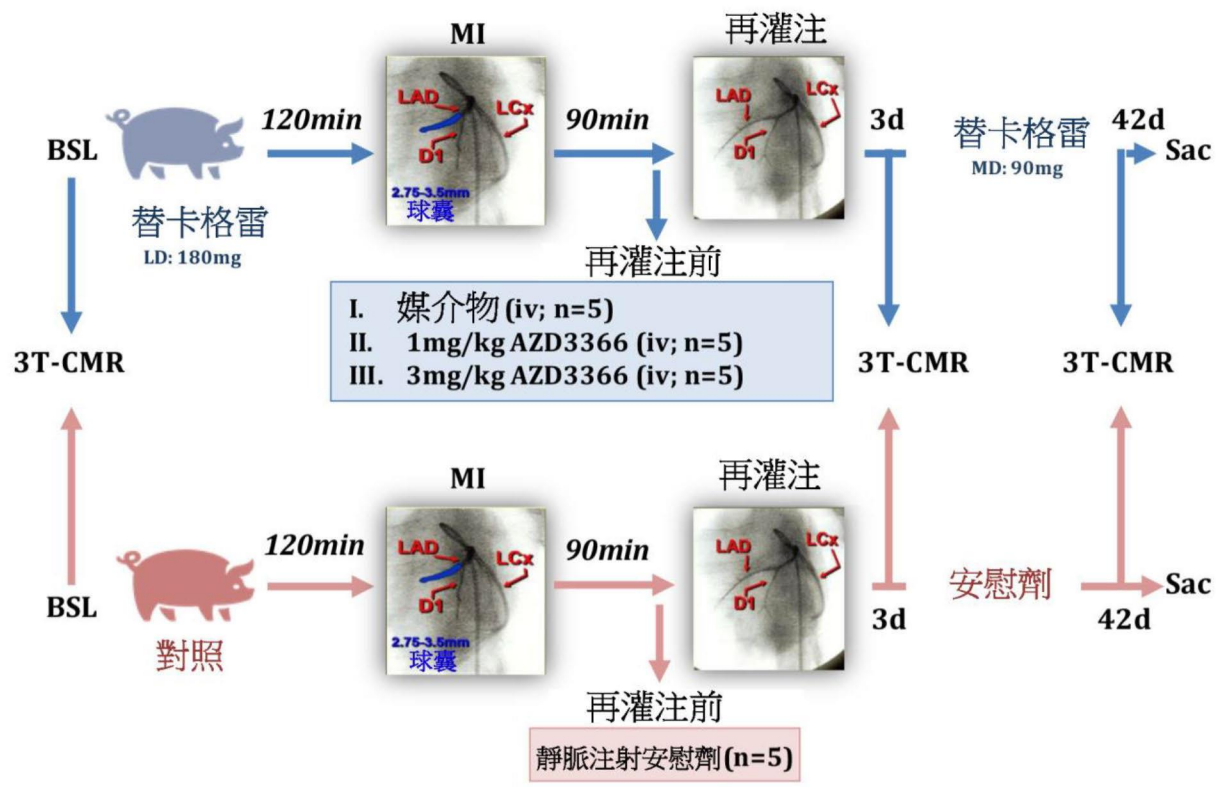
【請求項21】 如請求項20所述之方法，或如請求項20所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該缺血性事件係ST段抬高型心肌梗塞（STEMI）。

【請求項22】 如請求項20或請求項21所述之方法，或如請求項20或請求項21所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中在缺血性事件發作後24小時或更短時間，或12小時或更短時間，或6小時或更短時間，將該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白連同該P2Y₁₂抑制劑一起投與於該患者。

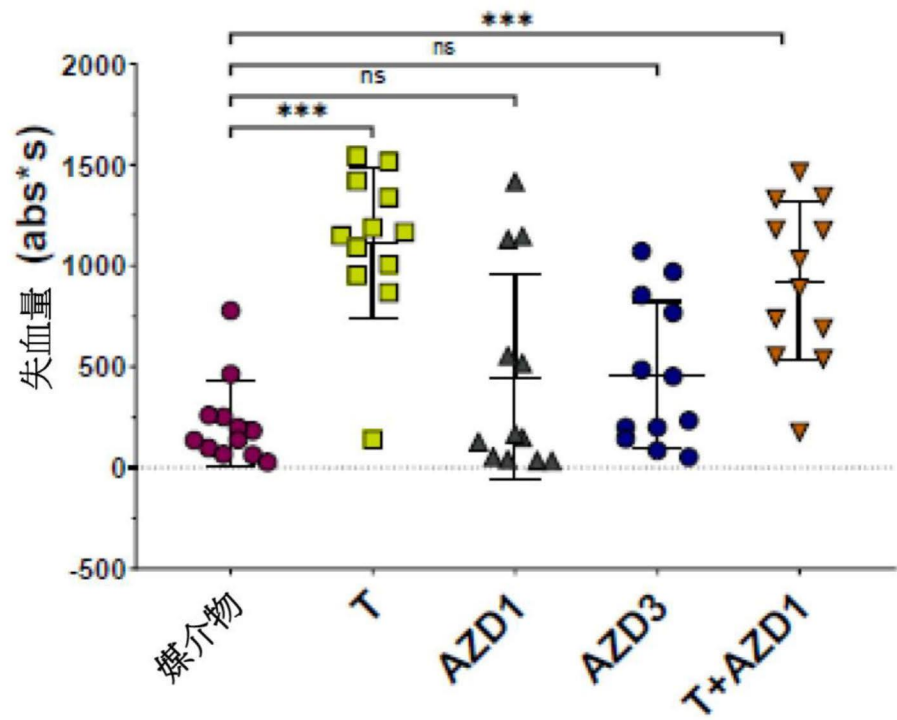
【請求項23】 如請求項20至22中任一項所述之方法，或如請求項20至22中任一項所述使用的重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制劑，其中該方法進一步包括在連同該P2Y₁₂抑制劑一起投與該重組腺苷三磷酸雙磷酸酶蛋白後少於

48小時、少於24小時、少於12小時、少於6小時，對該患者進行手術或非手術再灌注治療，視需要其中該手術或非手術再灌注治療係經皮冠狀動脈介入治療（PCI）、血栓切除術或溶血栓治療。

【發明圖式】



【圖1】



【圖2】