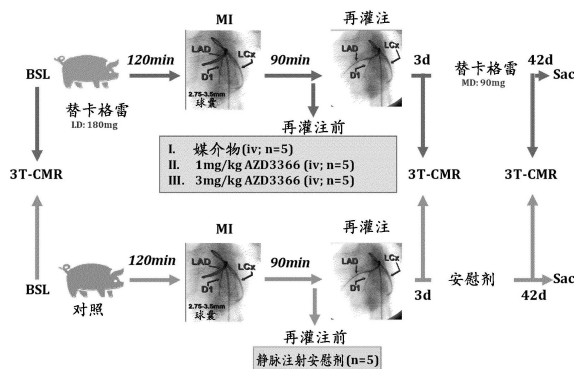




(43) 申请公布日 2023.05.09

序列表4页 附图1页

本发明涉及通过连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白来治疗患者的缺血性事件,特别是ST段抬高型心肌梗塞和急性缺血性卒中的方法。



1. 一种治疗患者的缺血性事件的方法,该方法包括连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

2. 一种在治疗患者的缺血性事件的方法中使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,该方法包括向该患者施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,其中该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同P2Y₁₂抑制剂一起施用。

3. 一种在治疗患者的缺血性事件的方法中使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂,该方法包括将该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同该P2Y₁₂抑制剂一起施用于该患者。

4. 一种在治疗患者的缺血性事件的方法中使用的P2Y₁₂抑制剂,该方法包括向该患者施用该P2Y₁₂抑制剂,其中该P2Y₁₂抑制剂连同重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白一起施用。

5. 根据权利要求1所述的方法,或根据权利要求1至4中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该方法包括向该患者同时施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和该P2Y₁₂抑制剂,或任选地在同一天向该患者依次施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和该P2Y₁₂抑制剂。

6. 根据权利要求5所述的方法,或根据权利要求5所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该方法包括

- a. 向该患者施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,接着依次施用该P2Y₁₂抑制剂;或
- b. 向该患者施用该P2Y₁₂抑制剂,接着依次施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

7. 根据权利要求1、5或6中任一项所述的方法,或根据权利要求2-6中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中在向该患者施用该P2Y₁₂抑制剂的24小时内或12小时内向该患者施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

8. 根据权利要求1和5至7中任一项所述的方法,或根据权利要求2至7中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该方法进一步包括在连同该P2Y₁₂抑制剂一起施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白之后至少24小时开始向该患者至少每天施用该P2Y₁₂抑制剂,任选地其中这些每天施用持续至少1个月、至少2个月、或至少6个月。

9. 根据权利要求1和5至8中任一项所述的方法,或根据权利要求2至8中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该P2Y₁₂抑制剂选自由以下组成的列表:替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定、普拉格雷和坎格雷洛。

10. 根据权利要求9所述的方法,或根据权利要求9所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该P2Y₁₂抑制剂为替卡格雷。

11. 根据权利要求1和5至10中任一项所述的方法,或根据权利要求2至10中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白是可溶性CD39L3蛋白,其包含与SEQ ID NO:1的位置49-485至少80%相同的氨基酸序列。

12. 根据权利要求11所述的方法,或根据权利要求11所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中与具有在SEQ ID NO:1的位置49-485中列出的氨基酸序列的参考CD39L3蛋白相比,该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含一个或多个修饰,其中该修饰产生与该参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比增强的ADP酶活性,或者其中所述修饰产生与该

参考腺苷三磷酸双磷酸酶相同的ADP酶活性以及与该参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比降低的ATP酶活性。

13. 根据权利要求12所述的方法,或根据权利要求12所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中与该参考CD39L3蛋白相比,该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白在位置67和69处包含取代,其中这些位置是根据SEQ ID NO:1编号的。

14. 根据权利要求13所述的方法,或根据权利要求13所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中位置67处的该取代是取代为甘氨酸而位置69处的该取代是取代为精氨酸。

15. 根据权利要求1和5至14中任一项所述的方法,或根据权利要求2至14中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含如SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列。

16. 根据权利要求1和5至15中任一项所述的方法,或根据权利要求2至15中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白以10mg至1000mg的剂量施用。

17. 根据权利要求1和5至16中任一项所述的方法,或根据权利要求2至16中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中:

- a. 该P2Y₁₂抑制剂为替卡格雷并且以60mg至200mg,任选地180mg的剂量施用;
- b. 该P2Y₁₂抑制剂为氯吡格雷并且以75mg至600mg,任选地300mg或600mg的剂量施用;
- c. 该P2Y₁₂抑制剂为噻氯匹定并且以250mg至500mg,任选地500mg的剂量施用;
- d. 该P2Y₁₂抑制剂为普拉格雷并且以5mg至60mg,任选地60mg的剂量施用;或
- e. 该P2Y₁₂抑制剂为坎格雷洛并且以30μg/kg静脉推注的剂量施用,随后以每分钟4μg/kg静脉输注的剂量施用。

18. 根据权利要求1和5至17中任一项所述的方法,或根据权利要求2至17中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该方法进一步包括向该患者施用阿司匹林,任选地其中该阿司匹林以50mg至325mg施用。

19. 根据权利要求1和5至18中任一项所述的方法,或根据权利要求2至18中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该缺血性事件是急性缺血性卒中。

20. 根据权利要求1和5至18中任一项所述的方法,或根据权利要求2至18中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该缺血性事件是急性冠状动脉综合征。

21. 根据权利要求20所述的方法,或根据权利要求20所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该缺血性事件是ST段抬高型心肌梗塞(STEMI)。

22. 根据权利要求20或权利要求21所述的方法,或根据权利要求20或权利要求21所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中在缺血性事件发作后24小时或更短时间,或12小时或更短时间,或6小时或更短时间,将该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同该P2Y₁₂抑制剂一起施用于该患者。

23. 根据权利要求20至22中任一项所述的方法,或根据权利要求20至22中任一项所述使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂,其中该方法进一步包括在连同该

P2Y₁₂抑制剂一起施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白后少于48小时、少于24小时、少于12小时、少于6小时,对该患者进行手术再灌注治疗,任选地其中该手术再灌注治疗是经皮冠状动脉介入治疗(PCI)。

用于治疗缺血的腺苷三磷酸双磷酸酶与P2Y₁₂抑制剂的组合

技术领域

[0001] 本发明涉及通过连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白来治疗患者的缺血性事件,特别是ST段抬高型心肌梗塞和急性缺血性卒中的方法。

背景技术

[0002] 心肌梗塞(MI)是全世界入院和死亡的主要原因(Asaria等人2017)。如果不加治疗,MI会由于缺乏血流(缺血)并因此缺氧而导致对心肌的不可逆的损伤。因此,MI治疗的主要目标是通过再灌注治疗来加快正常冠状动脉血流的恢复,目的是减少心肌损伤。再灌注治疗通常涉及与诸如经皮冠状动脉介入治疗(PCI)等手术技术组合,使用疗法来增加血流量并减少血栓形成。早期再灌注和PCI是优选的并且与改善的预后相关,有指南建议PCI应在MI症状发作的12小时内进行(Ibanez等人2018)。

[0003] 有几种治疗策略可用于处理血栓形成,并且分为两类:基于蛋白质的治疗剂和小分子治疗剂。小分子治疗剂的实例包括P2Y₁₂受体抑制剂,诸如氯吡格雷(clopidogrel)、替卡格雷(ticagrelor)、普拉格雷(prasugrel)和坎格雷洛(cangrelor),它们因能够抑制血小板和预防血凝块而著称。已在临床试验中证明了氯吡格雷和替卡格雷两者在降低心血管发病率和死亡率方面的有效性,并且这两种药物均已被批准用于预防血栓形成事件。例如,国家卫生与临床优化研究所(National Institute for Health and Care Excellence, NICE)推荐替卡格雷与低剂量阿司匹林组合使用长达12个月,作为成人急性冠状动脉综合征(ACS)的治疗。然而,这些P2Y₁₂受体抑制剂确实会增加出血风险,并因此需要注意确保患者根据处方信息和当前指南接受这种治疗。

[0004] 最近的研究已经探索了重组腺苷三磷酸双磷酸酶作为基于蛋白质的治疗剂的用途。腺苷三磷酸双磷酸酶(胞外ATP二磷酸水解酶)构成了一类催化ATP代谢为ADP和ADP代谢为AMP的酶。在体内,通过腺苷三磷酸双磷酸酶诱导ATP和ADP水解而产生的AMP被泛在表达的细胞外CD73/胞外-5'-核苷酸酶转化为腺苷。第一种已知的人类腺苷三磷酸双磷酸酶CD39最初被鉴定为活化淋巴细胞和内皮细胞上的一种细胞表面蛋白,并且各种体外和体内研究显示腺苷三磷酸双磷酸酶能够维持血管完整性并在生理上抑制炎症和血栓形成(Robson等人2005)。

[0005] 腺苷三磷酸双磷酸酶降低ATP和ADP与所有三种血小板P2受体(P2X₁、P2Y₁和P2Y₁₂)的相互作用,从而起到抑制血小板活化和募集的作用。与P2Y₁₂受体的小分子抑制剂形成对比,使用腺苷三磷酸双磷酸酶来消耗ADP和ATP水平不会导致临床前模型中出血水平的增加。腺苷三磷酸双磷酸酶除具有抗血小板作用外,还具有心脏保护作用,这被认为是通过以下方式介导的:i)促炎性ATP和ADP分子的消耗;和ii)通过腺苷三磷酸双磷酸酶作用产生的增加的抗炎腺苷水平。Moeckel等人(2014)的图1中提供了内源性腺苷三磷酸双磷酸酶作用机理的更多信息。

[0006] Moeckel等人(2014)报道了人类CD39家族的成员可溶性CD39L3的重组优化形式的设计和产生。所得的重组蛋白称为“APT102”或“AZD3366”。作者报道称,这种重组蛋白表现

出的二磷酸腺苷酶活性是天然腺苷三磷酸双磷酸酶的四倍且血浆半衰期是天然腺苷三磷酸双磷酸酶的50倍,并且在动物模型中用APT102进行治疗减小了梗塞面积而不会增加出血时间。在该模型中,单独用氯吡格雷进行的相应治疗没有心脏保护作用,而将APT102与氯吡格雷组合的治疗并未改变单独用APT102所见的保护功效(Moeckel等人(2014)的图6)。

[0007] 尽管最佳的抗血小板和抗血栓治疗涉及P2Y₁₂受体抑制剂(诸如替卡格雷),每年仍有10%左右发生新的心肌梗塞事件的风险,并且增加这些治疗的强度会增加出血风险而不会提高功效(Wallentin等人,2009;Jernberg等人,2015)。因此,仍然需要可用于治疗缺血性事件(诸如心肌梗塞)的有效且安全的治疗方法。鉴于以上考虑而设计了本发明。

发明内容

[0008] 本发明的诸位发明人已经确定,与单独使用单独的P2Y₁₂抑制剂相比,连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白提供改善的心脏保护益处。这表明组合治疗可以用作心脏缺血性事件诸如心肌梗塞(例如ST段抬高型心肌梗塞)和脑部缺血性事件(如急性缺血性卒中)的有效治疗,并且例如可用于预防或改善由缺血性事件引起的伤害(例如,由于心肌梗塞形成的心脏损伤,或由于急性缺血性卒中形成的脑损伤)。

[0009] 具体而言,诸位发明人证明,在心肌梗塞(MI)的动物模型中,连同P2Y₁₂抑制剂(例如替卡格雷)一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白(例如AZD3366)在减小梗死面积和改善心脏功能方面惊人地有效。然而在Moeckel等人(2014)的图6中报道的结果则称使用P2Y₁₂抑制剂不影响用单独的AZD3366所观察到的心脏保护作用。

[0010] 此外,不希望受到理论的束缚,据信由组合治疗提供的改善的心脏保护作用至少部分地是由P2Y₁₂抑制剂导致细胞外腺苷水平升高引起的。由于据报道AZD3366的心脏保护作用还涉及递增的细胞外腺苷水平,因此出乎意料的是,作用于相同途径和调节相同终产物的水平的两种药剂(P2Y₁₂抑制剂和重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白)的组合使用会诱导比通过单独使用单一药剂所观察到的更强的心脏保护作用。

[0011] 还确定了连同替卡格雷一起施用AZD3366与单独的替卡格雷相比,在动物模型中并未显著增加出血水平。这很重要,因为这表明与单独使用P2Y₁₂抑制剂相比,例如用于治疗那些已经批准P2Y₁₂抑制剂用于治疗的病状,就使用组合治疗时增加出血而言不存在显著的附加风险。

[0012] 这些结果与先前的临床试验观察结果形成对比,在临床试验中一直观察到,在相同途径或互补途径上增加抗血小板活性或增加抗血栓形成活性会增加与任何有益功效作用一起的出血风险。

[0013] 因而,所提出的组合出乎意料地是其中可以通过靶向和增强归因于诸如MI的环境中的相同生物途径的作用来改善净临床益处的第一实例。

[0014] 因此,本披露的一个方面提供了一种治疗患者的缺血性事件的方法,该方法包括连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

[0015] 在另一方面,本披露提供了一种在治疗患者的缺血性事件的方法中使用的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,该方法包括向该患者施用该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,其中该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同P2Y₁₂抑制剂一起施用。

[0016] 在另一方面,本披露提供了一种在治疗患者的缺血性事件的方法中使用的重组腺

苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂,该方法包括将该重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同该P2Y₁₂抑制剂一起施用于该患者。

[0017] 在另一方面,本披露提供了一种在治疗患者的缺血性事件的方法中使用的P2Y₁₂抑制剂,该方法包括向该患者施用该P2Y₁₂抑制剂,其中该P2Y₁₂抑制剂连同重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白一起施用。

[0018] 在另一方面,本披露提供了重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和/或P2Y₁₂抑制剂在制造用于治疗患者的缺血性事件的药物中的用途,该治疗包括连同P2Y₁₂抑制剂一起将重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白施用于患者。

[0019] P2Y₁₂抑制剂可以选自由替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定、普拉格雷和坎格雷洛组成的组。在一些实施例中,P2Y₁₂抑制剂选自由替卡格雷、氯吡格雷和普拉格雷组成的组。优选地,P2Y₁₂抑制剂是替卡格雷或氯吡格雷。甚至更优选地,P2Y₁₂抑制剂是替卡格雷。

[0020] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以是重组人CD39L3腺苷三磷酸双磷酸酶,任选地是可溶性重组人CD39L3腺苷三磷酸双磷酸酶。如US 7247300B1、EP 2133430B1和EP 2523971B1中任一项所述,腺苷三磷酸双磷酸酶可以是可溶性CD39L3或ADP酶增强的腺苷三磷酸双磷酸酶。示例性的重组人CD39L3腺苷三磷酸双磷酸酶在这里作为SEQ ID NO:2提供。

[0021] 在一些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白是可溶性CD39L3蛋白,其包含与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%相同的氨基酸序列,其中重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白保留了ADP酶活性和ATP酶活性。在一些实施例中,与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含一个或多个修饰(例如氨基酸取代),其中所述参考腺苷三磷酸双磷酸酶可以是野生型腺苷三磷酸双磷酸酶(例如具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的腺苷三磷酸双磷酸酶)或可溶性腺苷三磷酸双磷酸酶(例如,具有SEQ ID NO:1的位置49-485中列出的氨基酸序列的可溶性腺苷三磷酸双磷酸酶)。

[0022] 这些修饰可以产生与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比增加的ADP酶活性或与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相同的ADP酶活性以及与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比降低的ATP酶活性。在一些实施例中,该一个或多个修饰可以包括位置67和69处的取代或由位置67和69处的取代组成,其中这些位置是根据SEQ ID NO:1编号的。位置67处的取代可以是取代为甘氨酸,而位置69处的取代可以是取代为精氨酸,或者位置67处的取代可以是取代为丙氨酸,而位置69处的取代可以是取代为精氨酸。优选地,位置67处的取代是取代为甘氨酸而位置69处的取代是取代为精氨酸。

[0023] 在一些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含与SEQ ID NO:2(AZD3366)中列出的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少98%、至少99%相同的氨基酸序列。在特定的示例性实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含如SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列。

[0024] 在一些情况下,发生缺血性事件时,患者可能已经在接受P2Y₁₂抑制剂的治疗。例如,替卡格雷在治疗急性冠状动脉综合征(ACS)中的处方信息描述以180mg“负荷”剂量开始治疗,然后在ACS事件后的第一年施用90mg“维持”剂量每天两次,并且在一年后施用60mg每天两次。因此,患者可能在过去2年中先前经历过既往缺血性事件,目前正在接受P2Y₁₂抑制剂长期治疗,例如当这里治疗的缺血性事件发生时,服用替卡格雷每天两次。如上所述,尽

管进行了最佳的抗血小板和抗血栓治疗,仍然存在发生新的缺血性事件的风险。

[0025] 例如,患者可能在进行本发明方法之前的先前72小时,或先前36小时,或先前48小时,或先前24小时,或先前20小时,或先前16小时内,或先前12小时,或先前8小时,或先前6小时内,已经接受了(已经施用了)P2Y₁₂抑制剂。在一些实施例中,例如在P2Y₁₂抑制剂是替卡格雷的情况下,患者在先前8-16小时例如12小时内已经接受了P2Y₁₂抑制剂(即作为每天施用两次的维持剂量的一部分)。

[0026] 在其他情况下,患者目前可能未接受P2Y₁₂抑制剂的治疗。将此类患者描述为“原初”患者。这包括患者从未施用P2Y₁₂抑制剂的情况以及患者先前已经施用了P2Y₁₂抑制剂但在进行本发明方法之前的至少24小时、48小时、72小时或一周未进行施用的情况。

[0027] 在优选的实施例中,该方法包括除了重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白之外,还将P2Y₁₂抑制剂施用于患者(例如,正在接受该P2Y₁₂抑制剂或另一种P2Y₁₂抑制剂治疗的患者,或原初患者)。通常,该方法包括以单独配制品的形式施用P2Y₁₂抑制剂和重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,这些单独配制品单独施用,例如同时或依次施用。熟练的医师或其他熟练的医务人员可以确定向患者施用每种治疗剂的最合适的方式。

[0028] 在使用依次施用时,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂优选在彼此的24小时、12小时、1小时或更优选在30分钟内施用。在一些实施例中,先施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,然后依次施用P2Y₁₂抑制剂。在其他实施例中,先施用P2Y₁₂抑制剂,然后依次施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

[0029] 在一些实施例中,正在治疗的缺血性事件是急性冠状动脉综合征。急性冠状动脉综合征包括ST段抬高型心肌梗塞(STEMI)、非ST段抬高型心肌梗塞(NSTEMI)和不稳定型心绞痛。在优选的实施例中,正在治疗的缺血性事件是患者中的ST段抬高型心肌梗塞(STEMI)。

[0030] 如本文所证明的,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白(例如AZD3366)和P2Y₁₂抑制剂(例如替卡格雷)的组合施用在心肌梗塞的临床前动物模型中产生心脏保护作用,组合施用与安慰剂以及单独使用P2Y₁₂抑制剂治疗相比,减小了梗死面积并且改善了心脏功能。如上所述,心肌梗塞后的早期再灌注是优选的并且与改善的预后相关。因此,在患有急性冠状动脉综合征(例如STEMI)的患者中连同P2Y₁₂抑制剂一起施用腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,应该优选在急性冠状动脉综合征发作后尽快进行,并且优选尽可能接近患者接受经皮冠状动脉介入治疗(PCI)的时间。

[0031] 在其他实施例中,正在治疗的缺血性事件是急性缺血性卒中。每年,在70 000人口中,有100名新患者发生缺血性卒中。在不治疗的情况下,一年内有55名患者死亡或产生依赖性。100名患者中的大多数发生轻度或短暂性卒中,并且仅接受抗血小板药物以减少复发。约25-35名患者接受再灌注治疗,这使5-6名患者免于死亡或依赖性,并增加了无残疾人数。因此,降低急性缺血性卒中(AIS)的发病率和死亡率是临床上尚未满足的需求。

[0032] 临床前和临床试验已经评估了P2Y₁₂抑制剂和阿司匹林在缺血性卒中事件后用于治疗 and/或预防卒中的用途。此外,临床前数据已经证明重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白AZD3366可在缺血性卒中动物模型中用于增强再灌注,减少再阻塞和减少颅内出血(Sun等人,2011;Tan等人,2014)。因此认识到,本文所述的临床前心肌梗塞动物模型中与AZD3366和P2Y₁₂抑制剂的组合施用相关的有益结果在缺血性卒中的治疗中也可以是有益的。例如,

与单独的P2Y₁₂抑制剂相比,组合治疗可以减小患有缺血性卒中的患者的梗死面积和/或减少脑损伤,并且实现这种效果而不会显著增加出血的风险。

[0033] 如下文更详细所述,口服P2Y₁₂抑制剂起效所需的时间通常为数小时,这意味着即使在缺血性事件(例如急性冠状动脉综合征)发作后很早就施用P2Y₁₂抑制剂,当患者未受到保护而免于相关损伤(例如,由于心肌梗塞形成的心脏损伤)时,有几个小时的时间。相比之下,已经在临床前模型中证实重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白AZD3366在施用的几分钟内就具有高水平的活性,并且维持这种活性超过24小时(Moeke1等人2015)。因此,认识到,早期施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,这将在心肌梗塞的初始阶段提供心脏保护作用,然后在患者的血流中有足够水平的P2Y₁₂抑制剂可生物利用,以便发挥心脏保护作用。

[0034] 因此,在一些实施例中,在缺血性事件(例如急性冠状动脉综合征诸如STEMI)发作后24小时或更短时间,或18小时或更短时间,或12小时或更短时间,或6小时或更短时间,或4小时或更短时间,或2小时或更短时间,或1小时或更短时间,或甚至30分钟或更短时间连同P2Y₁₂一起向患者施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。在一些实施例中,该方法进一步包括在连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白后少于48小时、少于24小时、少于12小时、少于6小时、少于3小时、少于2小时、或少于1小时,对患者进行手术再灌注治疗(例如PCI)。在特定的实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂在手术再灌注治疗(例如PCI)期间在患者的血流中保持生物可利用。

[0035] 在一些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白以10mg至1000mg的剂量施用。

[0036] 在一些实施例中,P2Y₁₂抑制剂是替卡格雷并且以60mg至200mg,例如60mg、90mg、120mg或180mg的剂量施用。在一些实施例中,替卡格雷以其推荐的180mg负荷剂量施用。

[0037] 在一些实施例中,P2Y₁₂抑制剂是氯吡格雷并且以75mg至600mg,例如75mg、150mg、225mg、300mg、375mg、450mg、525mg或600mg的剂量施用。在一些实施例中,氯吡格雷以其推荐的300mg或600mg的负荷剂量施用。

[0038] 在一些实施例中,P2Y₁₂抑制剂是噻氯匹定并且以250mg至500mg,例如250mg或500mg的剂量施用。在一些实施例中,噻氯匹定以其推荐的500mg负荷剂量施用。

[0039] 在一些实施例中,P2Y₁₂抑制剂是普拉格雷并且以5mg至60mg,例如5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg或60mg的剂量施用。在一些实施例中,噻氯匹定以其推荐的60mg负荷剂量施用。

[0040] 在一些实施例中,P2Y₁₂抑制剂是坎格雷洛并且以30μg/kg静脉推注的剂量施用,随后以每分钟4μg/kg静脉输注的剂量施用。

[0041] 在一些实施例中,该方法进一步包括向患者施用阿司匹林,例如使得重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同P2Y₁₂抑制剂和阿司匹林一起施用。在这些实施例中,该方法通常包括以单独配制品的形式施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白、P2Y₁₂抑制剂和阿司匹林,这些单独配制品单独施用,例如同时或依次施用。阿司匹林可以50mg至325mg的剂量施用。

[0042] 本发明的另一方面涉及试剂盒,该试剂盒包含本文所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂,任选地其中该试剂盒进一步包含阿司匹林。

[0043] 本发明包括所描述的方面和优选特征的组合,除非明显不容许或明确避免此类组合的情况外。

附图说明

[0044] 现将参考附图来讨论说明本发明原理的实施例和实验,在附图中:

[0045] 图1说明了实验方案,该实验方案用于检查在心肌梗塞的猪动物模型中,就减少梗死面积和改善心脏功能而言,施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白AZD3366是否比单独施用替卡格雷赋予额外的益处。BSL=基线;MI=心肌梗塞;Sac=处死;CMR=心脏磁共振评估。

[0046] 图2示出了从小鼠尾出血实验获得的结果,示出了在施用替卡格雷(T)、1mg/kg AZD3366(AZD1)、3mg/kg AZD3366(AZD3)以及组合施用AZD3366和替卡格雷(T+AZD1)之后测得的失血量。结果证明,组合施用AZD3366和替卡格雷并未使失血量增加高于单独的替卡格雷(T)所见的失血量。示出的是平均值±SEM。ns;不显著,***;P<0.001(单因素方差分析+ Dunnet多重比较检验)。

具体实施方式

[0047] 现将参考附图来讨论本发明的各方面和实施例。对于本领域技术人员而言,其他方面和实施例将是显而易见的。该文本中提及的所有文件均通过援引并入本文。

[0048] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白

[0049] 腺苷三磷酸双磷酸酶(EC 3.6.1.5)催化三磷酸腺苷(ATP)的磷酸酐键水解为一磷酸腺苷(AMP)以及二磷酸腺苷(ADP)的磷酸酐键水解为AMP。CD39家族成员(也称为胞外核苷三磷酸二磷酸水解酶(E-NTPD酶)家族成员)代表了一些最佳表征的腺苷三磷酸双磷酸酶。人CD39家族成员包括下表中列出的天然蛋白质:

[0050]	天然蛋白质的名称	另外的名称	NCBI登录号
	CD39	ATPD酶、胞外腺苷三磷酸双磷酸酶、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

[0051] 在一些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白是重组人腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白或其工程化型式。在一些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白是CD39家族的成员,例如上表中列出的天然蛋白质中的任一种,或其工程化型式。

[0052] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以是可溶性重组人腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,例如缺乏一些或全部构成腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的跨膜结构域的氨基酸残基的腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,它可以是CD39家族的成员。例如,人CD39L3是SEQ ID NO:1中所示的529个

氨基酸残基蛋白。特定的示例性可溶性CD39L3腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白具有如SEQ ID NO: 1的位置49-485列出的氨基酸序列。

[0053] 在重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的上下文中,术语“工程化”或“其工程化型式”意指该工程化蛋白具有与参考腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白相似但不相同的氨基酸序列。参考腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以是野生型腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白(例如全长CD39L3腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白)或可溶性腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白(例如具有如SEQ ID NO:1的位置49-485列出的氨基酸序列的蛋白质)。工程化的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以包含一个或多个氨基酸取代,例如与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比改变酶活性(例如ADP酶活性)的取代,和/或基本上不改变参考腺苷三磷酸双磷酸酶的酶活性的功能保守性取代。工程化的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以具有与参考腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。例如,SEQ ID NO:2中列出的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白(AZD3366)是可溶性CD39L3腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的工程化型式,其具有如SEQ ID NO:1的位置49-485列出的氨基酸序列。

[0054] 在优选的实施例,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白是CD39L3蛋白或其工程化型式。重组腺苷三磷酸双磷酸酶可具有与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%相同的氨基酸序列。在甚至更优选的实施例,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白是可溶性CD39L3蛋白或其工程化型式。重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以具有与如SEQ ID NO:1的位置49-485列出的氨基酸序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0055] 包括CD39L3工程化型式(例如增强型腺苷三磷酸双磷酸酶)在内的可溶性重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的设计、产生和用途在US 7247300B1、EP 2133430B1和EP 2523971B1中有描述,其全部通过援引以其全文并入本文。本文所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以是那些出版物中描述的任何腺苷三磷酸双磷酸酶。

[0056] EP 2133430B1描述了ADP酶增强型腺苷三磷酸双磷酸酶。这些ADP酶增强型腺苷三磷酸双磷酸酶包括参考腺苷三磷酸双磷酸酶的修饰形式,其中修饰产生与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比增加的ADP酶活性或与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相同的ADP酶活性以及与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比降低的ATP酶活性。示例性的ADP酶增强型腺苷三磷酸双磷酸酶包括在CD39L3的位置67和69处包含取代的那些,其中位置编号是依照SEQ ID NO:1的。具体地,如EP 2133430B1中所述,ADP酶增强型腺苷三磷酸双磷酸酶包括蛋白质8742,其包含R67G和T69R取代;以及蛋白质8906,其包含R67A和T69R取代。

[0057] EP 2133430B1中披露了用于测定这种活性的示例性ATP酶和ADP酶测定法。例如,可以在37°C下在1ml溶液中测定纯化的可溶性ADP酶增强型腺苷三磷酸双磷酸酶的ATP酶和ADP酶活性,该溶液含有8mM CaCl_2 、200 μM 底物(对于ATP酶而言为ATP或对于ADP酶而言为ADP)、50mM咪唑和50mM Tris (pH 7.5) (Picher等人,Biochem.Pharmacol.[生化药理学](1938)51:1453)。可以终止反应并且可以通过添加0.25ml孔雀石绿试剂来测量释放的无机磷酸盐(Baykov等人,Anal.Biochem.[分析生物化学](1988)171:266)。基于在630nm下的分

光光度分析,一个单位的ATP酶(或ADP酶)对应于在37℃下每分钟释放1 μ mol无机磷酸盐。可以通过将数据拟合到例如Michaelis-Menten方程中来获得酶的关键动力学常数(诸如Km和kcat)。可用于监测生物化学功能的其他测定法包括但不限于放射测定法、HPLC测定法(两者均由Gayle Ill等人描述(J.Clin Invest.[临床研究杂志](1998)101:1851-1859))或放射TLC测定法(由Marcus,A.J.等人描述(J.Clin Invest.[临床研究杂志](1991)88:1690-1696))。

[0058] 因此,与具有如SEQ ID NO:1的位置49-485列出的氨基酸序列的参考腺苷三磷酸双磷酸酶(即CD39L3的可溶性型式)相比,本文所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以包含一个或多个修饰(例如氨基酸取代)。这些修饰可以产生与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比增加的ADP酶活性或与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相同的ADP酶活性以及与参考腺苷三磷酸双磷酸酶相比降低的ATP酶活性。在一些实施例中,该一个或多个修饰可以包括位置67和69处的取代或由位置67和69处的取代组成,其中这些位置是根据SEQ ID NO:1编号的。位置67处的取代可以是取代为甘氨酸,而位置69处的取代可以是取代为精氨酸,或者位置67处的取代可以是取代为丙氨酸,而位置69处的取代可以是取代为精氨酸。优选地,位置67处的取代是取代为甘氨酸而位置69处的取代是取代为精氨酸。

[0059] EP 2523971B1描述了腺苷三磷酸双磷酸酶和产生腺苷三磷酸双磷酸酶的方法,这些腺苷三磷酸双磷酸酶包含同源N-端,例如使得80%的腺苷三磷酸双磷酸酶分子具有构成EVL P的相同N-端。将这些具有同源N-端的蛋白质描述为具有在3.0至4.5范围内的平均等电点和/或在兔子和猪体内具有增强的半衰期。

[0060] 因此,本文所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以包含同源N-端,使得超过80%的腺苷三磷酸双磷酸酶分子具有相同的N-端,该N-端为EVL P,如EP 2523971B1中所述。

[0061] 在某些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以进一步包含一个或多个功能保守性取代(例如,除了上述的ADP酶增强型腺苷三磷酸双磷酸酶中的取代之外)。与等效的未取代的蛋白质相比,功能保守性取代是不影响(或基本上不影响)一种或多种功能特性(例如酶活性)的取代。在一些实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个功能保守性取代。

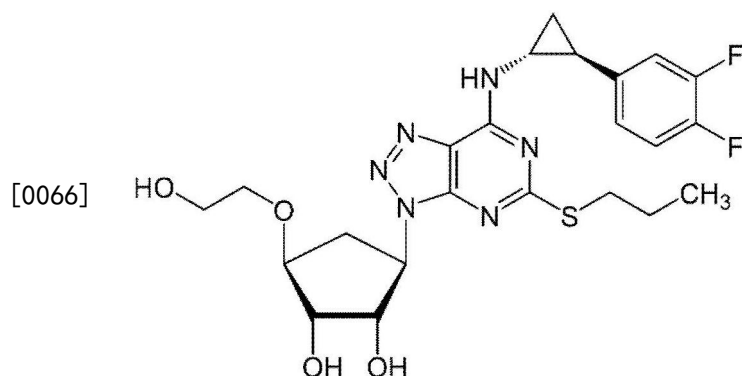
[0062] 在优选的实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含与SEQ ID NO:2至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,任选地其中位置67处的氨基酸残基是甘氨酸并且位置69处的氨基酸残基是精氨酸,其中这些位置是根据SEQ ID NO:1编号的。例如,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,具有1个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个)功能保守性取代,任选地其中位置67处的氨基酸残基是甘氨酸并且位置69处的氨基酸残基是精氨酸,其中这些位置是根据SEQ ID NO:1编号的。为避免疑义,根据SEQ ID NO:1的氨基酸残基位置67和69分别对应于根据SEQ ID NO:2的氨基酸残基位置19和21。在示例性的实施例中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0063] P2Y₁₂抑制剂

[0064] P2Y₁₂抑制剂可以选自由以下组成的列表:替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定、普拉格雷和坎格雷洛。本文提及P2Y₁₂抑制剂包括这些化合物中的任何一种以及任何代谢物,例如

活性代谢物。在一些实施例中，P2Y₁₂抑制剂可以选自由以下组成的列表：替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定和普拉格雷，例如选自由以下组成的列表：替卡格雷、氯吡格雷和普拉格雷。在优选的实施例中，P2Y₁₂抑制剂可以是替卡格雷或氯吡格雷。在特别优选的实施例中，P2Y₁₂抑制剂是替卡格雷。

[0065] 替卡格雷[(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[[[(1R,2S)-2-(3,4-二氟苯基)环丙基]氨基]-5-(丙硫基)-3H-1,2,3-三唑并[4,5-d]嘧啶-3-基]-5-(2-羟基乙氧基)-1,2-环戊二醇]是预防急性冠状动脉综合征患者中的血栓形成事件的开发中的可逆性结合的口服P2Y₁₂受体拮抗剂。它具有以下化学结构：



[0067] 替卡格雷是称为BRILINTA®(或在欧洲称为BRILIQUE)的药品中的活性成分，该药品已在包括美国和欧洲在内的多个管辖区批准使用。替卡格雷目前以60mg和90mg速释片的形式销售。WO 2008/024045披露了用于口服施用的某些含有替卡格雷的药物配制品。WO 2017/182589披露了替卡格雷的快速崩解口服剂型。

[0068] 替卡格雷通常在口服施用后被迅速吸收。与氯吡格雷和普拉格雷不同，替卡格雷不是前药，不需要代谢活化就能发挥活性。替卡格雷也被广泛代谢，其中替卡格雷及其活性且大致等效的代谢物(AR-C124910XX)构成血浆中的主要循环组分。替卡格雷及其活性代谢物的血浆浓度以剂量依赖性方式增加；分别在大约1.5小时和2.5小时内达到峰值浓度。在一个剂量后大约2小时观察到血小板凝集的最大抑制作用，并且这在一个剂量后维持超过8小时。替卡格雷及其活性代谢物的平均消除半衰期在药物标签中分别描述为7小时和9小时。停药后，血小板活性在5天后恢复到基线。

[0069] 在优选的实施例中，替卡格雷以180mg负荷剂量的形式连同重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白一起口服施用。替卡格雷可以以口服分散片(ODT)的形式施用，例如如WO 2017/182589中所述。可以在负荷剂量之后，施用一个或多个后续维持剂量，例如不含重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。如上所述，在180mg的初始负荷剂量之后，替卡格雷的处方信息描述在ACS事件后的第一年每天两次施用90mg的维持剂量并且在一年后每天两次施用60mg。该一个或多个后续维持剂量可以包括每天两次的90mg替卡格雷剂量，或每天两次的60mg替卡格雷剂量。处方信息进一步描述与75-100mg的阿司匹林日维持剂量一起施用替卡格雷。因此，该一个或多个后续维持剂量可以进一步包括施用75-100mg的阿司匹林日剂量。

[0070] P2Y₁₂-受体抑制剂可以是氯吡格雷。氯吡格雷通常经由口服途径施用。在一些实施例中，氯吡格雷以300mg或600mg负荷剂量的形式连同重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白一起施用。一个或多个后续维持剂量可以包含约75mg的氯吡格雷并且可以在负荷剂量之后施用，例如不含重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。如同上述替卡格雷一样，维持剂量的氯吡格雷可

以与75-100mg的阿司匹林日剂量一起施用。

[0071] 氯吡格雷是前药,需要代谢活化才能发挥其活性。口服给药后大约30-60分钟,出现活性代谢物的血浆峰值浓度,在施用后2小时左右观察到剂量依赖性的血小板凝集抑制作用。口服施用单剂量后,可以在2小时内观察到剂量依赖性的血小板凝集抑制作用。75mg单剂量后氯吡格雷的消除半衰期为大约6小时,而其活性代谢物的消除半衰期为大约30分钟。停药后,血小板凝集和出血时间在约5天后逐渐恢复到基线。

[0072] P2Y₁₂-受体抑制剂可以是普拉格雷。普拉格雷通常经由口服途径施用。在一些实施例中,普拉格雷以60mg负荷剂量的形式连同重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白一起施用。一个或多个后续维持剂量可以包含约5mg或10mg的普拉格雷并且可以在负荷剂量之后施用,例如不含重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。如同上述替卡格雷一样,维持剂量的普拉格雷可以与75-100mg的阿司匹林日剂量一起施用。

[0073] 普拉格雷是前药,并且快速代谢为具有药理活性的代谢物。在给药后大约30分钟出现活性代谢物的血浆峰值浓度。它的消除半衰期为约7.4小时。

[0074] P2Y₁₂-受体抑制剂可以是噻氯匹定。噻氯匹定通常经由口服途径施用。在一些实施例中,噻氯匹定通常经由口服途径施用。在一些实施例中,噻氯匹定以500mg负荷剂量的形式连同重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白一起施用。一个或多个后续维持剂量可以包含约250mg的噻氯匹定并且可以在负荷剂量之后施用,例如不含重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。如同上述替卡格雷一样,维持剂量的噻氯匹定可以与75-100mg的阿司匹林日剂量一起施用。

[0075] 通常在口服施用后2小时左右观察到噻氯匹定的血浆峰值水平。单剂量后的半衰期范围为7至13小时。重复给药后的半衰期为约4至5天。

[0076] P2Y₁₂-受体抑制剂可以是坎格雷洛。坎格雷洛可以以推注形式,以连续输注形式或以推注随后连续输注的形式静脉内施用。在一些实施例中,坎格雷洛以30μg/kg静脉推注的形式施用,随后立即以每分钟4μg/kg静脉输注的形式施用。

[0077] 坎格雷洛在开始输注30分钟内迅速达到稳态血浆水平和血小板凝集抑制作用,并且血浆半衰期短,大约小于9min。在15min内达到最大的血小板抑制作用。坎格雷洛的消除半衰期为约3-6分钟,并且血小板反应通常在停药15分钟内恢复到基线。

[0078] 治疗与施用

[0079] 本文描述的使用的方法和产品用于治疗患者(例如人类患者)中的缺血性事件,缺血性事件包括其中供血限于患者身体的特定部分(例如患者的心脏或脑部),其中该限制可能是由血凝块(血栓)引起的疾病和病症。心脏缺血性事件包括急性冠状动脉综合征。脑部缺血性事件包括急性缺血性卒中(AIS)。急性冠状动脉综合征包括分类为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,及不稳定型心绞痛。在优选的实施例中,治疗是对患者中ST段抬高型心肌梗塞(STEMI)的治疗。

[0080] 心肌梗塞在临床上通常分类为STEMI和NSTEMI。这些基于心电图(ECG)的变化并且可以由医师或其他熟练的医务人员进行诊断。心肌梗塞的类型可以根据Thygesen等人2018年提出的心肌梗塞通用定义进行定义或从该通用定义得出。

[0081] 在本文所述的治疗方法中,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同P2Y₁₂抑制剂一起施用。在该上下文中,术语“连同”的使用旨在意指在施用后(例如30分钟内,或1小时内,或2小

时内,或3小时内),P2Y₁₂抑制剂(和/或其代谢物)与重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白两者在患者血流中均生物可利用。在动物模型中,重组P2Y₁₂抑制剂AZD3366的施用在5分钟内变得有活性并且3至4周不会恢复到基线,而P2Y₁₂抑制剂通常在施用后需要更长时间才变得有活性。例如,通常直到一个剂量后2小时左右才观察到替卡格雷的最大活性,并且这维持超过8小时。

[0082] 因此,为了重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白连同P2Y₁₂抑制剂一起施用,不一定总是同时物理施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂。相反,可以先施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂中的一种,随后(例如一小时或更长时间内)再施用另一种药剂,条件是在施用后,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂两者在患者的血流中均生物可利用。

[0083] 此外,一些表现出缺血性事件的患者可能已经在定期施用P2Y₁₂抑制剂,例如作为先前缺血性事件后维持剂量的一部分。此类患者在本文中称为“目前正在接受P2Y₁₂抑制剂治疗”。例如,通常每天两次,作为维持剂量的一部分,施用90mg剂量的替卡格雷。在根据本文的方法施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的此类患者中,由于认为P2Y₁₂抑制剂(和/或其代谢物)在患者血流中仍具有生物活性,因此不一定总是需要施用另一剂量的该抑制剂。替代性地,可以施用比P2Y₁₂抑制剂的正常负荷剂量减少的剂量,以便使血流中生物活性P2Y₁₂抑制剂的水平达到最高。例如在替卡格雷的情况下,如果替卡格雷在患者血流中仍具有生物活性,则可以施用60mg或90mg或150mg的剂量,与180mg的典型负荷剂量完全不同。有效剂量可以由熟练的医师或其他熟练的医务人员确定。然而,优选地,即使患者目前正在接受P2Y₁₂抑制剂治疗,该方法仍然包括向患者施用P2Y₁₂抑制剂(例如负荷剂量)。

[0084] 如果最后剂量的抑制剂是在与P2Y₁₂抑制剂的平均消除半衰期相对应,超过P2Y₁₂抑制剂的平均消除半衰期的两倍,或超过P2Y₁₂抑制剂的平均消除半衰期的三倍,或超过P2Y₁₂抑制剂的平均消除半衰期的五倍的时间段内施用的,则仍然可以认为P2Y₁₂抑制剂在患者的血流中具有生物活性。例如,在替卡格雷的情况下,替卡格雷的平均消除半衰期为7小时,其活性代谢物的平均消除半衰期为9小时。因此,如果最后一个剂量是在最近9小时内、最近18小时内、最近27小时内、最近36小时内、或最近45小时内,则可以认为替卡格雷在患者的血流中具有生物活性。替代性地,可以认为P2Y₁₂抑制剂在血流中具有生物活性,直到在停止给药后活性恢复到基线为止(在替卡格雷的情况下是在5天后)。

[0085] 其他表现出缺血性事件的患者可能先前尚未施用过P2Y₁₂抑制剂,或者可能已停止先前的P2Y₁₂抑制剂施用,例如以致不再认为P2Y₁₂抑制剂在患者血流中具有生物活性。这些患者可以称为“原初”患者。在原初患者中,为了连同P2Y₁₂抑制剂一起施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白,该方法必须包括向患者施用P2Y₁₂抑制剂的步骤。

[0086] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂可以以组合配制品的形式,例如经由静脉注射施用。替代性地,向患者施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂可以是同时的或依次。如本文所用,同时施用是指基本上在同一时间(例如在彼此的10分钟内、5分钟内或1分钟内),任选地经由不同的施用途向患者施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂两者。例如,将在通过口服施用提供P2Y₁₂抑制剂的1分钟内静脉注射重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白认为是同时施用。

[0087] 在使用依次施用时,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂优选在彼此的24

小时、18小时、12小时、6小时、2小时、1小时内或更优选在30分钟内施用。在一些实施例中，先施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白，然后依次施用P2Y₁₂抑制剂。在其他实施例中，先施用P2Y₁₂抑制剂，然后依次施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

[0088] 在一些实施例中，在缺血性事件（例如急性冠状动脉综合征诸如STEMI）发作后24小时或更短时间，或18小时或更短时间，或12小时或更短时间，或6小时或更短时间，或4小时或更短时间，或2小时或更短时间，或1小时或更短时间，或甚至30分钟或更短时间连同P2Y₁₂抑制剂一起向患者施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。本文所指的缺血性事件的发作可以是在缺血性事件的一种或多种症状（例如在STEMI的情况下是胸痛）的发作时间或在诊断（例如在急性冠状动脉综合征的情况下经由心电图诊断）时，诊断可以在患者到达医院（或其等同的场所）治疗之前或之后不久进行。

[0089] 优选地，在对患有急性冠状动脉综合征的患者进行手术再灌注治疗（例如经皮冠状动脉介入治疗（PCI））之前，连同P2Y₁₂抑制剂一起向患者施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。

[0090] PCI可以包括但不限于气囊血管成形术、支架植入、旋转或激光斑块切除术和/或近距离放射治疗。在植入支架的情况下，支架可以是但不限于本领域已知的裸金属支架、药物洗脱支架、可吸收支架等。

[0091] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂的组合提供的心脏保护作用可用于预防和/或减轻归因于再灌注治疗后循环恢复而引起的任何心脏组织损伤或功能损伤。因此，在一些实施例中，该方法进一步包括在施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白后少于48小时、少于24小时、少于12小时、少于6小时，对患者进行手术再灌注治疗（例如PCI）。在一些实施例中，重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂均在进行手术再灌注治疗（例如PCI）之前施用于患者。在其他实施例中，重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白在进行手术再灌注治疗（例如PCI）之前施用于患者，而P2Y₁₂抑制剂在进行手术再灌注治疗之后不久，例如6小时内、4小时内、2小时内、或1小时内施用。在一些实施例中，重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂在手术再灌注治疗（例如PCI）期间在患者的血流中保持生物可利用。

[0092] 本披露包括其中组合了上述关于以下各项的时间安排中的任一种的实施例：i) 同时或依次施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂的时间安排；ii) 与缺血性事件发作有关的施用的时间安排；以及iii) 与手术再灌注治疗（例如PCI）有关的施用的时间安排。例如，该方法可以包括在缺血性事件发作的6小时内施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白，其中该方法进一步包括在少于12小时、或少于6小时内对患者进行手术再灌注治疗（例如PCI），并且其中在施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的6个小时内向患者施用P2Y₁₂抑制剂，任选地其中在进行手术再灌注治疗（例如PCI）之前向患者施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和P2Y₁₂抑制剂两者。

[0093] 本文所述的任何方法可以进一步包括向患者施用阿司匹林。阿司匹林通常以与P2Y₁₂抑制剂和重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白分开的单独配制品的形式施用，并且与P2Y₁₂抑制剂和重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白中的任何一种或两者同时或依次施用。在一些实施例中，阿司匹林在施用P2Y₁₂抑制剂的24小时、18小时、12小时、6小时、2小时、1小时内或更优选在30分钟内施用。在一些实施例中，阿司匹林在施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的24小时、18小时、12小时、6小时、2小时、1小时内或更优选在30分钟内施用。在一些实施例中，

阿司匹林与P2Y₁₂抑制剂或重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白同时施用。在一些实施例中,在缺血性事件(例如急性冠状动脉综合征(诸如STEMI))发作后24小时或更短时间,或18小时或更短时间,或12小时或更短时间,或6小时或更短时间,或4小时或更短时间,或2小时或更短时间,或1小时或更短时间,或甚至30分钟或更短时间连同P2Y₁₂抑制剂一起向患者施用阿司匹林。

[0094] 阿司匹林可以以50mg至325mg,或50mg至350mg(例如50mg、75mg、100mg、125mg、150mg、162mg、175mg、200mg、225mg、250mg、275mg、300mg、325mg或350mg)的剂量施用于患者。在一些实施例中,阿司匹林以50mg至200mg,或100mg至200mg(例如162mg)的剂量施用于患者。在一些实施例中,阿司匹林以200mg至350mg,或250mg至325mg(例如300mg或325mg)的剂量施用于患者。在一些实施例中,阿司匹林以75mg至150mg或75mg至100mg的剂量施用于患者。

[0095] 如本文在治疗病状的上下文中所用,术语“治疗”通常涉及人类的治疗和疗法,其中实现了一些期望的治疗效果,例如,抑制病状的进展,并且包括进展速率的降低、进展速率的停止、病状的消退、病状的改善和病状的治愈。还包括作为预防措施的治疗(即预防、防止)。

[0096] 可以通过例如推注、静脉内、肌肉内、皮下、吸入、连续输注、持续释放或其他药学上可接受的技术来给予本文所述的重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的施用。理想地,重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白将以含有生理上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药学上可接受的形式施用于患者。此类稀释剂和赋形剂可以由中性缓冲盐水溶液、抗氧化剂(例如抗坏血酸)、低分子量多肽(例如<10个氨基酸的多肽)氨基酸、碳水化合物(例如葡萄糖、右旋糖、蔗糖或右旋糖酐)、螯合剂(诸如EDTA)、稳定剂(诸如谷胱甘肽)组成。另外,为了酶的最大活性,可以在给药时施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的共底物,例如钙(Ca²⁺)。选择此类载体和稀释剂以在推荐的剂量和浓度下对患者无毒。

[0097] 本文所述的P2Y₁₂抑制剂的施用将取决于所用的特定P2Y₁₂抑制剂。例如,替卡格雷、氯吡格雷、噻氯匹定和普拉格雷通常以药学上可接受的口服剂型施用于患者,而坎格雷洛通常经由静脉注射施用于患者。

[0098] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的剂量要求可根据年龄、种族、体重、身高、性别、治疗持续时间、施用方法、重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白的生物活性以及病状严重程度或其他临床变量而有显著差异。有效剂量可以由熟练的医师或其他熟练的医务人员确定。

[0099] 该方法可以包括连同合适剂量(例如负荷剂量)的P2Y₁₂抑制剂和任选地阿司匹林(如果存在)一起,以单个有效剂量的形式施用重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白。虽然通常仅使用单个有效剂量的重组腺苷三磷酸双磷酸酶,但该方法可以进一步包括周期性地并且在负荷剂量之后,作为长期治疗或维持治疗的一部分,施用一个或多个口服剂量的P2Y₁₂抑制剂。例如,P2Y₁₂抑制剂可以例如在初始负荷剂量之后,例如以上述维持剂量每天施用一次或两次,持续数周、数月或甚至数年。如本领域中已知的,维持剂量的P2Y₁₂抑制剂可以与阿司匹林一起施用。缺血性事件后P2Y₁₂抑制剂的长期治疗或维持治疗是本领域已知的,并且适当的剂量和时间安排可以由熟练的医师或其他熟练的医务人员确定。

[0100] 重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白可以作为包含重组腺苷三磷酸双磷酸酶蛋白和药学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物施用。P2Y₁₂抑制剂可以作为包含P2Y₁₂抑制剂和

药上可接受的载体或稀释剂的药物组合物施用。

[0101] 如本文所用,术语“药上可接受的”涉及化合物、成分、材料、组合物、剂型等,其在合理的医学判断范围内适合与讨论的受试者(例如人)的组织接触使用,没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的受益/风险比相称。在与配制品的其他成分相容的意义上,每种载体、稀释剂、赋形剂等也必须是“可接受的”。

[0102] 以其特定形式或根据用于执行所披露的功能的方式、或者用于获得所披露的结果的方法或过程来表达的在前面的说明书或在以下权利要求书或在附图中披露的特征,视情况可以单独地,或者以此类特征的任何组合的方式用于以其各种形式来实现本发明。

[0103] 虽然已经连同上述示例性实施例一起描述了本发明,但是当给出本披露时,许多等同修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,认为以上阐述的本发明的示例性实施例是说明性的而不是限制性的。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所描述的实施例进行各种改变。

[0104] 为了避免任何疑问,提供本文提供的任何理论解释是为了提高读者的理解。诸位发明人不希望受到任何这些理论解释的束缚。

[0105] 本文使用的任何章节标题只是出于组织的目的,而不应被解释为限制所描述的主题。

[0106] 除非上下文另有要求,否则在本说明书(包括后面的权利要求书)全篇,词语“包含”和“包括”及变型应当被理解为暗指包括所陈述的整数或步骤或者多个整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤或者多个整数或步骤的组。

[0107] 必须指出的是,如本说明书和所附权利要求书中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”、“一种(个)”和“该”包括复数指示物。本文可以将范围表述为“约”一个特定值,和/或至“约”另一个特定值。在表述此类范围时,另一个实施例包括从该一个特定值开始和/或到另一个特定值。类似地,通过使用先行词“约”将值表述为近似值时,应该理解该特定值形成了另一个实施例。相对于数值的术语“约”是任选的并且意指例如 $\pm 10\%$ 。

[0108] 实例

[0109] 实例1-用于在猪中进行的实验的材料和方法

[0110] 实验设计

[0111] 将常规食物喂养的长白猪($n=20$;重量约等于40kg)随机(Excel随机函数)分成四组以接受:

[0112] I) 口服安慰剂对照(心肌梗塞(MI)诱导前2h, $n=5$)

[0113] II) 负荷剂量的替卡格雷(180mg; $n=5$;MI诱导前2h口服)

[0114] III) 负荷剂量的替卡格雷(180mg; $n=5$;MI诱导前2h口服和再灌注前10min静脉注射1mg/kg AZD3366)

[0115] IV) 负荷剂量的替卡格雷(180mg; $n=5$;MI诱导前2h口服和再灌注前10min静脉注射3mg/kg AZD3366)

[0116] 此后,猪接受冠状动脉左中前降支(实验MI)的暂时性(90分钟)球囊阻断,然后再灌注,基本上如Vilahur等人2016所述。在接下来的42天内,猪每天接受安慰剂(I组)或替卡格雷(90mg/每天两次,II至IV组)的口服维持给药,并在MI后的第3天(早期重塑阶段)和第42天(晚期重塑阶段)进行连续心脏磁共振(CMR)评估。

[0117] 在图1中示意性地说明了该实验设计。

[0118] MI的实验诱导

[0119] 在MI诱导的当天,动物接受丁丙诺啡(buprenorphine) (0.03mg/kg) 和头孢唑啉(25mg/kg) 分别作为对疼痛和伤口感染的预防,然后通过施用氯胺酮(ketamine) (30mg/kg)、甲苯噻嗪(xylazine) (2.2mg/kg) 和阿托品(atropine) (0.05mg/kg) 的肌肉内注射进行麻醉。一旦镇静下来,就对动物进行气管内插管,并通过异氟烷吸入(2%) 维持麻醉。在开始MI诱导程序之前,开始通过置于耳边缘静脉中的管线输注在1.000mL盐水(250mL/h) 中的胺碘酮(amiodarone) (300mg) 和利多卡因(lidocaine) (150mg),作为对恶性室性心律失常的预防,并且施用肝素推注(100U/kg) 以防止导管中形成凝块。如先前在Vilahur等人2016中所述,实验上通过冠状动脉左前降支中部的微创闭合性胸心肌球囊阻断来诱导MI。完全冠状动脉缺血(通过血管造影术证实) 维持90分钟。在缺血期结束时,球囊完全放气,使动物恢复。在整个程序中连续记录心电图(ECG) 和血液动力学参数,并且在MI诱导前后使用配备有S5-1扇形阵列换能器的超声心动图系统(Phillips iE33) 记录左心室射血分数的初始恶化(LVEF,使用胸骨旁长轴视图的M模式分析;Vilahur等人2016)。

[0120] 3T-CMR采集与分析:整体和区域性结构及功能分析

[0121] 在MI后第3天(早期重塑阶段) 和第42天(晚期重塑阶段) 连续地在所有动物中进行CMR研究。在3.0T-CMR系统(AchievaVR,荷兰阿姆斯特丹的飞利浦公司(Philips, Amsterdam, The Netherlands) P) 上进行研究,并且由对治疗不知情的CMR专业技术人员进行CMR图像采集。对于CMR研究,通过肌肉注射由氯胺酮、甲苯噻嗪和阿托品组成的混合物对动物进行麻醉,并通过连续静脉输注异丙酚维持以确保机械通气。一旦将动物处于头朝上的仰卧位,并在胸部上方放置了柔性相控阵表面线圈,就可以使用ECG门控来获取心脏的静态图像。在所有情况下均获取以下专用CMR序列:“电影”(cine) 平衡稳态自由进动(Balanced Steady-State Free Precession, bSSFP) 成像序列,用于评估室壁运动(WM) 和心脏功能;T2加权短tau反转恢复(T2w-STIR) 序列,用于评估心肌水肿;早期钆增强,用于研究微血管阻塞(无复流现象);和晚期钆增强(LGE),用于评估心肌坏死的量和程度。所有CMR研究都遵循相同的方案。首先,获得侦察图像[T1超快速场回波(turbo field echo, TFE) 序列] 以定位心脏的真实轴并限定涉及整个心脏的视野。之后,在水平和垂直长轴(四腔观和二腔观) 以及覆盖整个左心室(LV) 的多个连续短轴图像中进行bSSFP电影成像。在短轴电影序列中,我们获取每个切片的24个心脏相位,以确保对WM和心脏功能的正确评价。一旦获得了电影序列,就获得了T2w-STIR序列以评估心肌水肿。此后,以0.1mmol/kg的剂量静脉注射基于钆的造影剂(Gd-GTPA, MagnevistVR, 美国新泽西州韦恩的伯莱克斯实验室公司(Berlex Laboratories Inc., Wayne, NJ, USA))。施用造影剂后1分钟,获取早期钆增强序列。施用造影剂后10分钟获得LGE序列。CMR序列的技术参数的详细信息以及整体和区域性功能/解剖学参数的分析方案先前已公开(Vilahur等人2016)。

[0122] 实例2-在猪心肌梗塞模型中AZD3366和替卡格雷对心脏损伤、功能和出血的影响

[0123] 进行实验以检查施用重组可溶性形式的ADP酶AZD3366(也称为APT102) 是否在减少梗死面积和改善心脏功能方面与单独的替卡格雷相比赋予另外的益处。方法和分析如实例1所述进行。

[0124] 心脏损伤评估

[0125] 下表提供了猪模型中心脏损伤评估实验的结果：

MI 后 3 天通过 CMR 评估的心脏损伤				
	安慰剂	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
[0126] LV 质量	70.0 ± 4.1	81.3 ± 7.4	75.0 ± 3.6	76.5 ± 2.2
水肿 (gr)	20.4 ± 1.7	10.5 ± 0.8*	7.3 ± 1.7*	6.4 ± 0.8*†
水肿占 LV 质量的%	29.8 ± 1.9	13.1 ± 0.9*	9.8 ± 2.3*	8.4 ± 0.9*†
坏死 (gr)	12.2 ± 1.5	6.6 ± 1.0*	5.2 ± 0.7*	3.2 ± 0.9*†
坏死占 LV 质量的%	7.7 ± 1.5	8.2 ± 1.2*	7.0 ± 0.9*	4.2 ± 1.2*†

[0127] *与安慰剂相比 $p < 0.05$; †与所有其他变量相比, $p < 0.05$

MI 后 42 天通过 CMR 评估的心脏损伤				
	安慰剂	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
[0128] LV 质量	100.6 ± 3.6	108.6 ± 6.9	107 ± 6.7	111.7 ± 9.4
坏死 (gr)	7.9 ± 0.9	4.7 ± 1.0*	4.5 ± 1.7*	3.4 ± 1.2*†
坏死占 LV 质量的%	7.8 ± 0.7	4.3 ± 0.8*	4.1 ± 1.5*	2.8 ± 1.0*†

[0129] *与安慰剂相比 $p < 0.05$; †与所有其他变量相比, $p < 0.05$

[0130] 与单独的替卡格雷相比, 替卡格雷+3mg/kg AZD 3366的坏死面积进一步减小, 并且替卡格雷+1mg/kg AZD3366的坏死面积数值较低证明该组合具有剂量依赖性增强的心脏保护作用。由于该模型是人类疾病的最佳临床前模型, 因此这是可以表明在人类中的治疗作用的最有力的证据。

[0131] 心脏功能评估

[0132] 下表提供了猪模型中心脏功能评估实验的结果：

通过 CMR 评估的整体和区域性心脏功能						
[0133]				替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366	
	时间	安慰剂	替卡格雷			
	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	

[0134] *与BSL(基线)相比 $p < 0.05$

[0135]

通过 CMR 评估的整体和区域性心脏功能					
	时间	安慰剂	替卡格雷	替卡格雷 + 1 mg/kg AZD3366	替卡格雷 + 3 mg/kg AZD3366
室壁运动 (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*

[0136] *与所有其他变量相比, $p < 0.05$

[0137] 与单独的替卡格雷相比, 替卡格雷+3mg/kg AZD 3366的室壁运动评分进一步提高, 证明心肌梗塞后心脏功能的治愈和恢复增强。同时发生梗死面积减小和功能改善将急性心脏保护作用模式与心脏功能恢复改善联系在一起。由于该模型是人类疾病的最佳临床前模型, 因此这是可以表明在人类中的治疗作用的最有力的证据。

[0138] 实例3-AZD3366和替卡格雷对小鼠尾出血的影响

[0139] 这项研究的目的是评价AZD3366单独或与替卡格雷组合在小鼠体内的出血风险和血小板凝集抑制作用。

[0140] 实验方案

[0141] 向C57B16小鼠施用AZD3366或媒介物的静脉推注。在单独的组中, 以推注和连续输注替卡格雷的形式向小鼠施用AZD3366和替卡格雷或仅替卡格雷。下表描述了分组、施用的剂量和体积:

[0142]

分组	治疗	剂量		体积	
		推注 (mg/kg)	输注 ($\mu\text{g/kg}\cdot\text{min}$)	推注 (mL/kg)	输注 ($\mu\text{L/kg}\cdot\text{min}$)
媒介物 (V)	5%甘露醇 + 缓冲液	NA	NA	1.0 + 1.0	200 + NA
替卡格雷 (T)	替卡格雷 + 缓冲液	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

[0143] 缓冲液=20mmol/L Tris、150mmol/L NaCl, pH7.4。NA;不适用。每个研究组中包括十二只动物。

[0144] 在 $t=20\text{min}$ 时,进行尾部横切,并记录60min的失血量和出血时间(BT)。在实验结束即 $t=80\text{min}$ 时,收集腹主动脉的血样用于血小板凝集评估以及后续的AZD3366和替卡格雷血浆浓度分析。

[0145] 出血模型

[0146] 给药后二十分钟,切割尾部5mm尖端引起出血。用水冲洗尾部,并将其置于血红蛋白敏感装置中。记录通过血液和水的混合物的光透射,并使用PharmLab软件(V6.0,瑞典哥德堡的阿斯利康研发中心(AstraZeneca R&D, Gothenburg, Sweden))将其转换为吸光度。将低于95%的透射率定义为出血。从切割尾部开始的60min内测量总失血量(出血曲线下面积, $t=20\text{min}$ 至 $t=80\text{min}$:累积失血量与时间,吸光度 $\times s$, $\text{abs}\times s$)和出血时间(BT)。

[0147] 血液和血浆分析

[0148] 将来自腹主动脉的血样收集在带有Terumo®Neolus27G、0.4x20mm针头(比利时鲁汶的泰尔茂欧洲分公司(Terumo Europe N.V., Leuven Belgium))的Omnifix®-F1mL注射器(德国埃门的布朗医疗公司(Braun Medical AG, Emmenbrücke, Germany))中。使用来匹卢定(lepirudin)(Refludan®拜耳医疗保健制药公司(Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc))作为抗凝剂,将10 μL 、5mg/mL添加到最多1mL血液中,得到7 $\mu\text{mol/L}$ 的最终血液浓度。将全血用于使用Multiplate®阻抗凝集计测量血小板凝集。通过以10000 $\times g$ 离心5min(丹麦哈维德夫的奥列迪克公司(Ole Dich, Hvidovre, Denmark))从剩余的血液中制备血浆。将血浆转移到新的试管中,并储存在-20°C下,用于稍后分析替卡格雷和AZD3366的总血浆浓度。

[0149] 取血样后立即将175 μL 全血添加到Multiplate®(德国曼海姆的罗氏诊断有限公司(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany))小型试验单元中,并与175 μL 37°C预热盐水(9mg/mL,德国巴特洪堡的费森尤斯卡比有限公司(Fresenius Kabi AG, Bad Homburg,

Germany)) 混合。3min后,添加12 μ L二磷酸腺苷(ADP,德国曼海姆的罗氏诊断有限公司)达到6.5 μ mol/L的最终测定浓度。测量反应6min并将数据表示为随时间(AU*min)记录的凝集单位(AU)的平均曲线下面积(AUC)。

[0150] 借助于液相色谱-质谱(LC-MS/MS)法测定替卡格雷的血浆浓度。

[0151] 通过ELISA测定AZD3366的血浆浓度,涉及用包被在96孔板上的小鼠抗AZD3366单克隆抗体(mAb2567,美国新泽西州普林斯顿的科文斯公司(Covance,Princeton,NJ,USA))捕获AZD3366,并用辣根过氧化物酶偶联的兔抗AZD3366多克隆抗体(pAb3939-HRP,科文斯公司(Covance)),使用TMB作为底物来监测结合的AZD3366。

[0152] 结果

[0153] 失血量和BT的结果呈现于下表中,并在图2中进行了说明。

失血量和出血时间(BT)				
分组	失血量(abs*s)		BT(s)	
	中值	范围(最低-最高)	中值	范围(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

失血量和出血时间(BT)				
分组	失血量(abs*s)		BT(s)	
	中值	范围(最低-最高)	中值	范围(最低-最高)
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

[0156] 与施用媒介物的动物相比,经替卡格雷治疗的动物的失血量和BT分别增加7.2倍($p<0.001$)和5.2倍($p<0.001$)。相比之下,以1mg/kg或3mg/kg的AZD3366治疗与失血量或BT与媒介物相比的统计学显著增加不相关。此外,与在仅施用替卡格雷的动物组中所见到的相比,替卡格雷和AZD3366组合组的失血量和BT并无差异。

[0157] 血小板凝集(PA)结果列于下表:

小鼠中 AZD3366 (AZD) 和替卡格雷 (T) 的血小板凝集抑制作用和血浆浓度			
分组	PA (AU*min)	T (μmol/L)	AZD (μg/mL)
媒介物	469 ± 34	-	-
[0158] 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

[0159] 因此,与替卡格雷(T)形成对比,AZD3366(1mg/kg和3mg/kg)完全抑制血小板凝集(PA)与出血量增加不相关(图2)。另外,AZD3366和替卡格雷的组合给药并未使出血量增加高于单独的替卡格雷所见的出血量。

[0160] 该实验的结果证明,替卡格雷和AZD3366的组合不会使出血量增加高于单独的替卡格雷所见的出血量。

[0161] 参考文献

[0162] 上面引用了许多出版物以便更全面地描述和披露本发明以及本发明所属领域的技术水平。下面提供了这些参考文献的完整引用。这些参考文献中的每一篇参考文献整体并入本文。

[0163] 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)

[0164] 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).2017ESC 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>

[0165] 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>

[0166] 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>

[0167] Sun,Guanghua&Zhao,Xiurong&Grotta,James&Savitz,Sean&Chen,Ridong&Aronowski,Jaroslav. (2011).Apyrase,APT102,Improves the Beneficial Effect of rt-PA In Experimental Thromboembolic Stroke.E302-E302.

[0168] 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>

[0169] 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>

[0170] 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.

[0171] 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>

[0172] For standard molecular biology techniques,see Sambrook,J.,Russel,D.W.Molecular Cloning,A Laboratory Manual.3ed.2001,Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press 序列

标识符	描述	序列
SEQ ID NO: 1	人CD39L3氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1的氨基酸残基49-485 为粗体)	MVTVLTRQPCEQAGLKALYRTPPTIIALVVLLVSIWVLSITVIQIHK Q EVLP PGLKYGIVLDAGSSRTTVYVYQWPAEKENNTGVVSQTFKCSV KSGISSYGNNPQDVPRAFEECMQKVKGQVPSHLHGSTPIHLGATAG MRLRLQNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIIISGQEEGVYGWI TANYLMGNFLEKNLWHMWVHPHGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKM DLNTSDIMQVSLYGYVYTLYTHSFQCYGRNEAEKKFLAMLLQNSPTK NHLTNPCYPRDYSISFTMGHVFDLSLCTVDQRPESYNPNDVITFEGTG DPSLCKEKVASIFDFKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPFVAFAGFYTYT ASALNLSGSFSLDTFNSSTWNFCSQNWSQLPLLLLPKFDEVYARSYCF SANYIYHLFVNGYKFTEETW PQ IHFEKEVGNSSIAWSLGYMLSLTNQ IPAES PLIRLPIEPPVFVGTLAFFTTAAALLCLAFLAYLCSATRKRKH SEHAFDHAVDSD
SEQ ID NO: 2	AZD3366氨基酸序列 (N端 EVLP 为粗体, R67G 和T69R氨基酸 取代为 斜体)	EVLP PGLKYGIVLDAGSS GTR VYVYQWPAEKENNTGVVSQTFKCSVK GSGISSYGNNPQDVPRAFEECMQKVKGQVPSHLHGSTPIHLGATAGM RLLRLQNETAANEVLESIQSYFKSQPFDFRGAQIIISGQEEGVYGWIT ANYLMGNFLEKNLWHMWVHPHGVETTGALDLGGASTQISFVAGEKMD LNTSDIMQVSLYGYVYTLYTHSFQCYGRNEAEKKFLAMLLQNSPTKN HLTNPCYPRDYSISFTMGHVFDLSLCTVDQRPESYNPNDVITFEGTGD PSLCKEKVASIFDFKACHDQETCSFDGVYQPKIKGPFVAFAGFYTA SALNLSGSFSLDTFNSSTWNFCSQNWSQLPLLLLPKFDEVYARSYCF ANYIYHLFVNGYKFTEETW PQ IHFEKEVGNSSIAWSLGYMLSLTNQ I PAES PLIRLPIEPPV

序列表

<110> 阿斯利康(瑞典)有限公司(AstraZeneca AB)
 <120> 用于治疗缺血的腺苷三磷酸双磷酸酶与P2Y12抑制剂的组合
 <130> 201079-W0-PCT
 <150> US 63/067,388
 <151> 2020-08-19
 <160> 2
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> 智人
 <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
Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr		240
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
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
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
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> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <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			

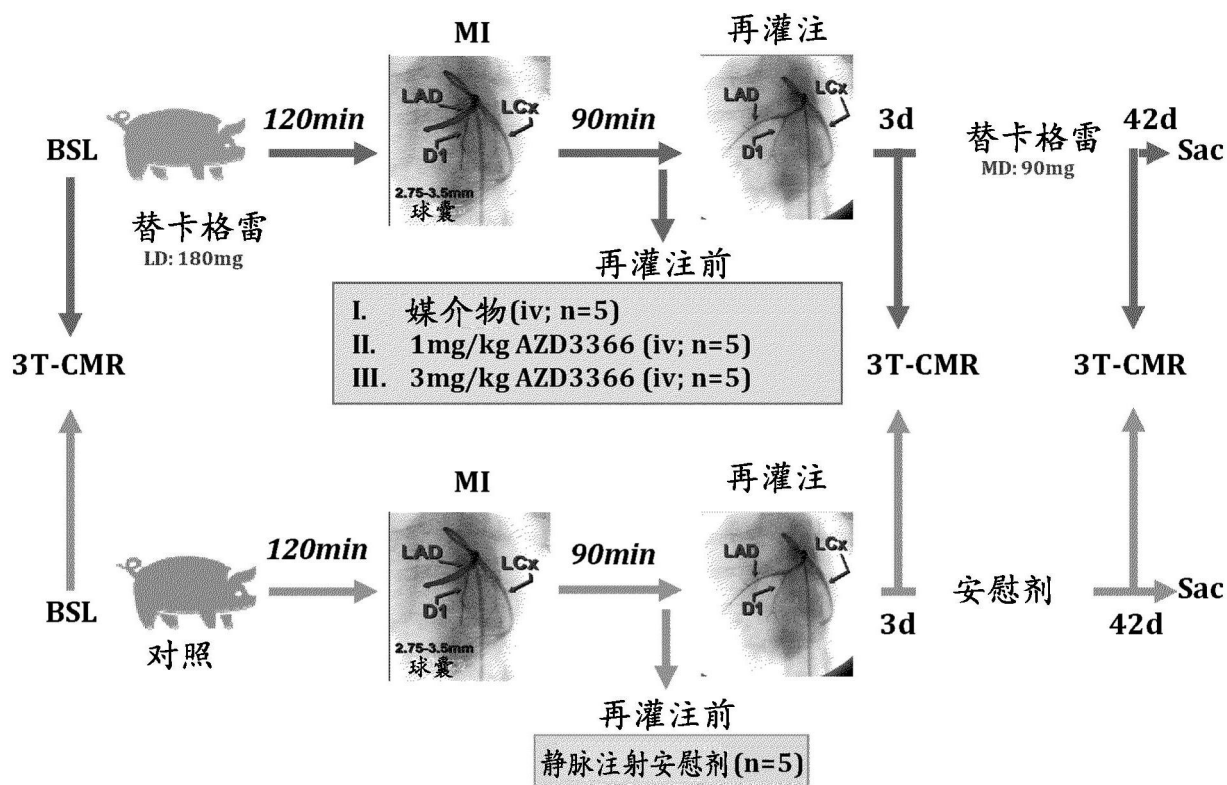


图1

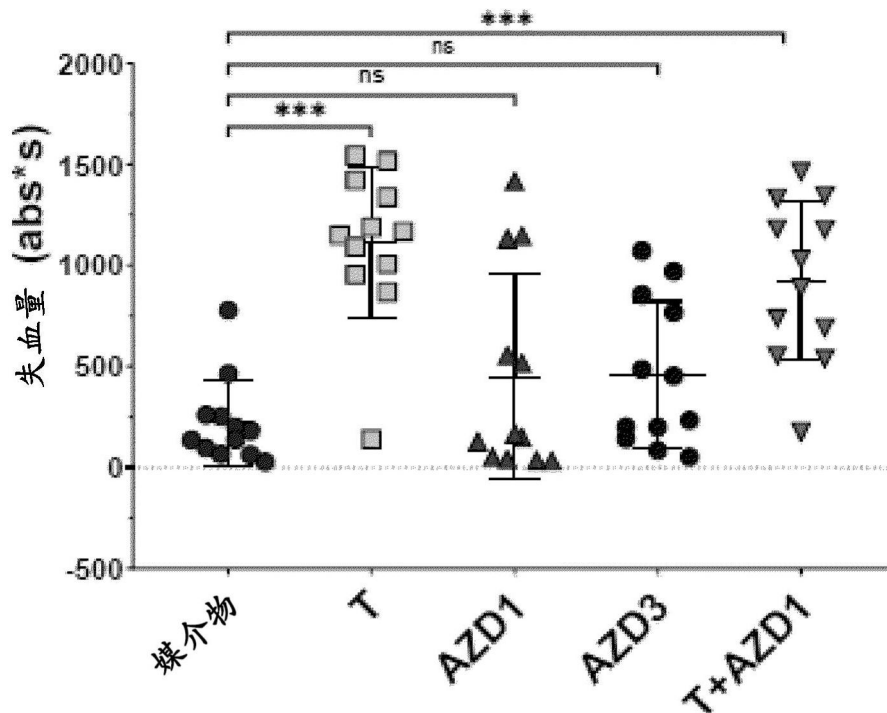


图2