

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/86 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880022878.8

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101688871A

[22] 申请日 2008.5.1

[21] 申请号 200880022878.8

[30] 优先权

[32] 2007.5.1 [33] US [31] 11/742,684

[86] 国际申请 PCT/US2008/062297 2008.5.1

[87] 国际公布 WO2008/137600 英 2008.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.12.30

[71] 申请人 阿库米特里斯克斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 巴里·S·科勒 丹尼斯·德宾

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 封新琴

权利要求书3页 说明书27页 附图4页

[54] 发明名称

测量用药物洗脱支架治疗的个体的血小板反应性的方法

[57] 摘要

本发明披露了一种测量在用药物洗脱支架(DES)治疗的个体中对血小板反应性的抑制作用的方法。首先,从用DES和P2Y12拮抗剂治疗的个体中得到血液样品。然后,将所述血液样品与含有附着的GPIIb/IIIa受体配体的颗粒、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素E1(PGE1)混合。将所述混合物在适于使颗粒凝集的条件下培养,并且在所述混合物中评估血小板介导的凝集。凝集的缺失或减少表明用DES治疗的个体具有降低的血小板反应性。本发明还披露了一种试剂盒,所述试剂盒用于测量P2Y12受体拮抗剂对血小板聚集的抑制作用,所述试剂盒包含固定在颗粒上的GPIIb/IIIa受体配体、二磷酸腺苷(ADP)、前列腺素E1(PGE1)、抗凝剂和将抗凝化血液维持在适于血小板聚集的条件下的缓冲液。

1. 一种测量在用药物洗脱支架(DES)治疗的个体中 P2Y12 拮抗剂对血小板反应性的抑制作用的方法, 所述方法包括如下步骤:

a)提供含有血小板的血液样品, 所述样品来自用 DES 和 P2Y12 拮抗剂治疗的个体;

b)使所述含有血小板的血液样品与颗粒、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E1(PGE1)在适于使所述颗粒通过所述血液样品中的所述血小板介导而凝集的条件下接触, 所述颗粒包含固定在其上的 GPIIb/IIIa 受体配体; 以及

c)评估所述凝集, 从而确定在所述个体中所述 P2Y12 拮抗剂对血小板聚集的抑制作用的存在、缺失和/或程度, 其中所述凝集的缺失或减少表明所述个体在应答所述 P2Y12 拮抗剂治疗中具有降低的血小板反应性。

2. 一种识别用药物洗脱支架(DES)治疗而处于支架血栓形成风险中的个体的方法, 所述方法包括如下步骤:

a)提供来自用 DES 和 P2Y12 拮抗剂治疗的个体的含有血小板的血液样品;

b)使所述含有血小板的血液样品与颗粒、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E1(PGE1)在适于使所述颗粒通过所述血液样品中的所述血小板介导而凝集的条件下接触, 所述颗粒包含固定在其上的 GPIIb/IIIa 受体配体;

c)评估所述凝集, 从而确定在所述个体中所述 P2Y12 拮抗剂对血小板聚集的抑制作用的存在、缺失和/或程度, 其中所述凝集的缺失或减少表明所述个体在应答所述 P2Y12 拮抗剂治疗中具有降低的血小板反应性; 以及

d)评估所述个体就支架血栓形成而言的风险水平。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述含有血小板的血液样品为全血样品。

4. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述含有血小板的血液样品为血浆样品。

5. 权利要求 4 的方法, 其中所述血浆样品为富含血小板的血浆(PRP)样品。

6. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述 P2Y12 拮抗剂为噻吩并吡啶类。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述噻吩并吡啶类为氯吡格雷。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述噻吩并吡啶类为噻氯匹定。
9. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述个体用 P2Y₁₂ 拮抗剂和阿司匹林治疗。
10. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述颗粒包含聚苯乙烯或胶乳。
11. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述颗粒包含红外线染料，含有血小板的血液样品和所述颗粒之间的接触形成测定混合物，由所述血小板介导的所述颗粒的凝集如下评估：用红外线光谱中的光照射所述测定混合物，并评估红外线在所述测定混合物中的透过性。
12. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 GPIIb/IIIa 受体配体包括选自如下的物质：血纤蛋白原、单克隆抗体 10E5、单克隆抗体 c7E3、冯维勒布兰德因子、纤连蛋白、玻连蛋白、具有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的配体和模拟 RGD 序列的肽或仿肽。
13. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 GPIIb/IIIa 受体配体为血纤蛋白原。
14. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 ADP 具有 2 至 35 μ M 的最终浓度，以及所述 PGE1 具有 2 至 30nM 的最终浓度。
15. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 ADP 具有 15 至 20 μ M 的最终浓度。
16. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 PGE1 具有 20 至 25nM 的最终浓度。
17. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述颗粒、ADP 和 PGE1 包含在测定介质中。
18. 权利要求 17 的方法，其中所述测定介质在约 800nm 处具有高吸收。
19. 权利要求 1 或 2 的方法，所述方法在范围为 30 $^{\circ}$ C 至 40 $^{\circ}$ C 的温度进行，从使含有血小板的血液样品、包含附着的 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒、ADP 和 PGE1 接触的时间起的读数总时间为约 10 秒至约 10 分钟。
20. 一种试剂盒，所述试剂盒用于测量在用药物洗脱支架(DES)治疗的个体中 P2Y₁₂ 受体拮抗剂对血小板聚集的抑制作用，所述试剂盒包含固定在颗粒上的 GPIIb/IIIa 受体配体、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E1(PGE1)。
21. 权利要求 20 的试剂盒，其还包含抗凝剂和使抗凝化血液的 pH 和盐浓度保持在适于血小板聚集的范围内的缓冲液。

22. 权利要求 20 的试剂盒, 其中所述 GPIIb/IIIa 受体配体包括选自如下的物质: 血纤蛋白原、单克隆抗体 10E5、单克隆抗体 c7E3、冯维勒布兰德因子、纤连蛋白、玻连蛋白、具有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的配体和模拟 RGD 序列的肽或仿肽。

23. 权利要求 20 的试剂盒, 其中所述 GPIIb/IIIa 受体配体包括血纤蛋白原。

24. 权利要求 20 的试剂盒, 其中所述颗粒包含聚苯乙烯或胶乳。

25. 权利要求 20 的试剂盒, 其中所述颗粒具有约 1 微米至约 8 微米的直径。

测量用药物洗脱支架治疗的个体的血小板反应性的方法

对相关申请的交叉参考

本申请要求 2007 年 5 月 1 日提交的美国申请 11/742,684 的权益，所述美国申请 11/742,684 是 2004 年 7 月 6 日提交的美国申请 10/886,155 的部分再申请，所述美国申请 10/886,155 要求 2003 年 7 月 8 日提交的美国申请 60/485,703 的权益。将上述所有申请全部并入本发明作为参考。

技术领域

本发明涉及诊断测定领域，并且特别涉及用于测量用药物洗脱支架 (drug-eluting stent)(DES)治疗的个体的血小板反应性(platelet reactivity)的方法和试剂盒。

背景技术

血小板在哺乳动物生理学中的作用是格外多样的，但它们的主要作用是促进止血。在许多情况下，评价血液凝结的能力是期望的，其是常常受血小板粘附和/或聚集能力控制的参数。因此，重要的是评估血小板的粘附功能。例如，重要的问题包括是否给予会阻断或促进凝块形成的药物，或是在外科手术前检测血小板功能的缺陷。重要的还有评价作为新药进行测试或在患者中用作批准的临床治疗的血小板抑制剂的有效性。

已知血小板在各种条件下和在许多不同试剂的存在下聚集。血小板聚集是用于描述血小板彼此结合的术语。体外血小板聚集依赖于在通过聚集诱导剂例如凝血酶、ADP 或胶原活化后血小板结合血纤蛋白原(fibrinogen)至其表面上的能力。

血小板在维持正常止血中发挥关键作用。当暴露于受损的血管时，血小板会粘附于暴露的内皮下基质。在最初的粘附后，在损伤部位释放或产生的各种因子(例如凝血酶、凝血酶、ADP 和胶原)活化血小板。一旦血小板被活化，在血小板糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体中就发生构象变化，这允许其结合

血纤蛋白原和/或冯维勒布兰德因子(von Willebrand factor)。

通过 GPIIb/IIIa 受体使多价血纤蛋白原和/或冯维勒布兰德因子分子结合到相邻血小板上，正是这种结合使其它血小板募集到受损部位，并且它们的聚集形成了止血塞(hemostatic plug)或血栓。

体外血小板集合度测定(aggregometry)是这样的实验室方法，其用于评估血小板体内形成导致初级止血塞的聚集物的能力。在这种技术中，将聚集剂(aggregating agent)例如凝血酶、ADP 或胶原加到全血或富含血小板的血浆中，并监测血小板的聚集。血小板集合度测定是这样的诊断工具，其可在患者诊断和疗法选择中其辅助作用。测量血小板聚集的目前测定是昂贵、费时、繁琐并通常不适于临床环境的。

已经开发出快速的血小板功能测定，并描述在美国专利 5,763,199(Coller)中。所述测定确定全血中的糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体阻断(blockade)。当用 GPIIb/IIIa 配体例如血纤蛋白原涂覆的小的聚合物珠子(polymeric bead)与含有血小板(其具有活化的未经阻断的 GPIIb/IIIa 受体)的全血接触时，导致所述珠子的凝集。没有凝集说明 GPIIb/IIIa 受体没有活化和/或 GPIIb/IIIa 受体没有阻断。在优选的实施方案中，加入凝血酶受体活化剂导致足够快速和便利以在临床进行的测定，以及如果 GPIIb/IIIa 受体未被阻断，则所述测定导致小的聚合物珠子在便利的已知的时段内凝集。所述测定包括在不打开收集容器(collection container)的情况下将待测试的血液从收集容器中转移到测定设备中的能力。这种血小板聚集测定可与活化凝结时间(ACT)同时进行，进行所述测定以评估肝素化的充足性(adequacy)。

血小板聚集在血栓形成和急性冠状动脉疾病的发病机理中发挥重要作用。有证据暗示，显著的血小板功能差异存在于对各种抗血小板剂的应答中。也已经证明，当 P2Y₁₂ 拮抗剂例如氯吡格雷(clopidogrel)用于治疗患者以得到抗聚集效果时，在血小板聚集方面存在个体间差异。一项研究的结果表明，在接受所述药物的患者中至少有 10%没有实现期望的对血小板聚集的抑制作用(Muller, et al., Thromb. Haemost.(2003)89(5):783-787)。

氯吡格雷和噻氯匹定(ticlopidine)是抑制血小板聚集的噻吩并吡啶衍生物。认为它们抑制 5-二磷酸-腺苷(ADP)与其受体之一即 P2Y₁₂ 受体的结合。氯吡格雷的药理学活性与噻氯匹定的药理学活性非常相似。然而，已经证

明氯吡格雷与噻氯匹定相比具有更少的副反应。基于有关氯吡格雷在血栓形成疾病(thrombotic disease)中的效力的确凿证据, 氯吡格雷和其它 P2Y₁₂ 拮抗剂的使用可能会显著增加。

因为许多患有心血管疾病的患者目前服用噻吩并吡啶药物之一, 所以检测对噻吩并吡啶的抗药性和评估噻吩并吡啶治疗的效力的方法将是有益的。因此, 需要开发这样的测定, 其会提供关于阿司匹林和噻吩并吡啶(例如氯吡格雷或噻氯匹定)在给定患者中的治疗敏感度和效力的信息。

已经用使用 ADP、胶原或其它血小板活化剂的血小板集合度测定评估了这些药物对血小板功能的作用。然而, 因为 ADP 活化至少两种不同的受体(P2Y₁ 和 P2Y₁₂ 以及还可能有 P2X₁), 所以其具有降低特异性和背景噪音的潜能。胶原是另一种选择。然而, 由于胶原的四级结构(这显著影响了其活化血小板的能力)和由于胶原源自生物组织并且对温度和 pH 的微小变化敏感这一事实, 胶原是高度可变的。胶原或 ADP 都不能提供对 P2Y₁₂ 受体的特异性, 因此它们本身不是用于确定 P2Y₁₂ 抑制剂效果的最佳选择。特别是如在几项研究中所已经证明的那样, 对这两种激动剂浓度的选择显著影响所测量的 P2Y₁₂ 拮抗剂的抑制程度。

前列腺素(PG)属于已知为类二十烷酸的普遍存在的一类化学物质。在身体的几乎每种组织中都发现了它们, 并且它们具有非常广谱的生物活性。类二十烷酸是花生四烯酸(一种多不饱和脂肪酸)的衍生物。术语类二十烷酸包括如下家族: 前列腺素(PG)家族、前列环素家族、血栓烷家族和白三烯家族。根据 PG 的结构将它们分成不同的家族, 每个家族用字母(A、E、F、G、H 或 I)命名。除了所述字母, 每种单独的前列腺素带有一个数字, 其表明在所述前列腺素的脂肪酸侧链中的双键数目。例如, 前列腺素 E₁(PGE₁)属于 E 家族并在其侧链中仅具有一个双键。PG 在血小板聚集和止血(血液凝结)中发挥重要作用, 并且通常具有显著的血管舒张剂作用。

PGE₁ 是二高- γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)的理论环加氧酶代谢产物, 但是其在正常人类或其它动物的血浆中实际上是检测不到的。其药理学作用包括血管舒张、低血压和抗血小板活性。已经证明, PGE₁ 通过增加血小板中的环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, CAMP)浓度来抑制血小板聚集。许多团队已经证明, PGE₁ 抑制 ADP 诱导的人血小板聚

集的 IC50 为约 40nM。

对血小板反应性进行的研究已经证明了在对氯吡格雷的抑制性应答中有广泛的个体间差异。回顾性研究和小的前瞻性研究已经证明了对氯吡格雷的差的应答与经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI)后的临床事件(clinical event)之间的关联。与氯吡格雷所致的聚集减少(通过对 ADP 的应答的减少百分比来判断)不同,氯吡格雷后的血小板聚集(即治疗后的反应性)的绝对值可能是对随后事件风险的充分测量。从临床观点来看,在 PCI 时对血小板反应性进行常规测量通常是不实际的,这是因为需要使用专门的实验室技术例如透光率集合度测定(LTA)。

药物洗脱支架(DES)是放置到变窄的患病的冠状动脉中的金属架,所述金属架将药物逐渐直接释放至动脉壁,从而阻断细胞增殖。如目前在临床实践中所使用的那样,术语“药物洗脱支架”指的是这样的金属支架,所述金属支架洗脱出被指定用于限制新血管内膜瘢痕组织(neointimal scar tissue)生长的药物,从而减少再狭窄(即安装有支架的动脉的阻断)的可能性。就治疗先天性冠状动脉变窄(native coronary artery narrowing)而言,目前临床使用的药物洗脱支架已经被证明是统计学上优于裸金属支架(bare-metal stent)(BMS)的,其具有严重有害心脏事件(将其定义为死亡的复合临床终点(composite clinical endpoint))的较低发生率、心肌梗塞(myocardial infarction)的较低发生率和再狭窄所需反复介入的较低发生率。

尽管对于药物洗脱支架来说较不常见,但 DES 仍然可能发生新血管内膜增殖(neointimal proliferation)并造成再狭窄。例如,在所述过程中、在所述过程后的紧随几天内或在较晚的时间可发生由血栓形成导致的支架阻塞(“支架血栓形成(stent thrombosis)”)。用抗血栓药物例如阿司匹林和氯吡格雷进行的治疗似乎减少血栓形成的风险,并且已经证明在构建药物洗脱支架后早早停用这些药物中的一种或两种将显著增加支架血栓形成和心肌梗塞的风险(Iakovou, et al., JAMA(2005)293(17):2126-2130)。

如上所述,不同的个体在对抗血栓药物例如氯吡格雷的血小板抑制性应答中存在广泛的差异。因此,急需提供用于测量用药物洗脱支架(DES)治疗的个体的血小板反应性的方法。

发明内容

本发明的目的是提供测量用药物洗脱支架(DES)治疗的个体的血小板反应性的方法。

本发明的另一目的是提供识别用 DES 治疗而处于支架血栓形成风险中的个体的方法。

本发明另一目的是提供测量在用 DES 治疗的个体中的氯吡格雷诱导的对血小板反应性的抑制作用的方法。

本发明的这些目的和其它目的在测量用 DES 治疗的个体的血小板反应性的方法中实现。首先,从用 DES 和 P2Y₁₂ 拮抗剂治疗的个体中得到血液样品。然后,将所述血液样品与含有附着的 GPIIb/IIIa 受体配体(attached GPIIb/IIIa receptor ligand)的颗粒、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E₁(PGE₁)混合。将所述混合物在适于使颗粒凝集的条件下培养,并且在所述混合物中评估血小板介导的凝集。凝集的缺失或减少表明用 DES 和 P2Y₁₂ 拮抗剂治疗的个体具有降低的血小板反应性。

另一个实施方案提供了测量具有 DES 的 PCI 患者的血小板反应性的可选择方法。从所述患者中得到血液样品。将所述血液样品与如下物质混合成组合(combination): 1)抗凝剂; 2)足以将抗凝化血液(anticoagulated blood)的 pH 和盐浓度维持在适于血小板聚集的范围内的缓冲液; 3)固定在固体表面上的血小板 GPIIb/IIIa 受体配体; 4)一种或多种增强信号转导途径的药物; 和 5)受体活化剂。将所述组合在用于使颗粒凝集的条件下培养。在所述混合物中评估血小板介导的凝集。凝集的缺失表明所述患者具有降低的形成血小板血栓(platelet thrombi)的能力。

另一个实施方案提供了测量具有 DES 的患者的血小板反应性的方法。将 ADP 血小板活化剂加入到得自所述患者的血液样品中。向所述样品中提供一种或多种血小板抑制剂。所述血小板抑制剂中的至少一种为前列腺素 E₁(PGE₁)。在对提供 ADP 血小板活化剂和一种或多种血小板抑制剂的应答中产生了交替信号转导途径(alternate signal transduction pathway)。在对产生所述交替信号转导途径的应答中, ADP 的最终浓度为约 2 至 35 μ M, 以及 PGE₁ 的最终浓度为约 2 至 30nM。在对最终浓度的 ADP 的应答中测量所述患者的血小板反应性。

本发明的一个实施方案提供了识别用 DES 治疗而处于支架血栓形成风险中的个体的方法。首先，从用 DES 和 P2Y₁₂ 拮抗剂治疗的个体中得到血液样品。然后，将所述血液样品与含有附着的 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E₁(PGE₁)混合。将所述混合物在适于使颗粒凝集的条件下培养，并在所述混合物中评估血小板介导的凝集。凝集的缺失或减少表明用 DES 和 P2Y₁₂ 拮抗剂治疗的个体具有降低的血小板反应性。基于血小板反应性的水平对个体的支架血栓形成的风险水平作出评估。

另一个实施方案提供了识别具有 DES 的处于支架血栓形成风险中的患者的方法。从所述患者中得到血液样品。将所述血液样品与如下物质混合成组合：1)抗凝剂；2)足以将抗凝化血液的 pH 和盐浓度维持在适于血小板聚集的范围内的缓冲液；3)固定在固体表面上的血小板 GPIIb/IIIa 受体配体；4)一种或多种增强信号转导途径的药物；以及 5)受体活化剂。将所述组合在用于使颗粒凝集的条件下培养。凝集的缺失表明所述患者具有降低的形成血小板血栓的能力。测量患者的血小板反应性。在对所述测量的应答中确定所述患者的支架血栓形成的风险水平。

本发明的一个实施方案提供了测量在用 DES 治疗的个体中的氯吡格雷诱导的对血小板反应性的抑制作用的方法。首先，从用 DES 和氯吡格雷治疗的个体中得到血液样品。然后，将所述血液样品与含有附着的 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E₁(PGE₁)混合。将所述混合物在适于使颗粒凝集的条件下培养，以及在所述混合物中评估血小板介导的凝集。凝集的缺失或减少表明用 DES 和氯吡格雷治疗的个体具有降低的血小板反应性。

另一个实施方案提供了确定患者是否具有氯吡格雷诱导的对血小板的抑制作用的可选择方法。从所述患者中得到血液样品。将所述血液样品与如下物质混合成组合：1)抗凝剂；2)足以将抗凝化血液的 pH 和盐浓度维持在适于血小板聚集的范围内的缓冲液；3)固定在固体表面上的血小板 GPIIb/IIIa 受体配体；4)一种或多种增强信号转导途径的药物；以及 5)受体活化剂。将所述组合在用于使颗粒凝集的条件下培养。在所述混合物中评估血小板介导的凝集。凝集的缺失表明患者具有降低的形成血小板血栓的能力。测量所述患者的血小板反应性。然后确定所述患者是否具有氯吡格

雷诱导的对血小板的抑制作用。

本发明的一个实施方案提供了一种试剂盒,所述试剂盒用于测量 P2Y₁₂ 受体拮抗剂对血小板聚集的抑制作用,所述试剂盒包括固定在颗粒上的 GPIIb/IIIa 受体配体、二磷酸腺苷(ADP)和前列腺素 E₁(PGE₁)。另一个实施方案还提供了抗凝剂和将抗凝化血液维持在适于血小板聚集的条件下的缓冲液。

附图说明

图 1 说明了来自用 P2Y₁₂ 受体拮抗剂治疗的血液样品的血小板聚集程度,其通过本发明的测定来测量。

图 2 显示了在实施例 3(CABG 为冠状动脉旁路移植(coronary artery bypass grafting); PCI 为经皮冠状动脉介入; SES 为西罗莫司(sirolimus)洗脱支架)中描述的临床研究的流程图。

图 3 说明了用于 VERIFYNOW™ P2Y₁₂ 测定的接收器工作特性(receiver-operating characteristic, ROC)曲线。观察到 0.711 的曲线下面积(P=0.03)。

图 4 说明了在具有高治疗后反应性和不具有高治疗后反应性的患者中没有医院外心血管死亡、非致死性心肌梗塞和支架血栓形成的存活率。

具体实施方式

除非另有定义,本文使用的所有科技术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。将本文提到的所有专利、专利申请(公开的或未公开的)和其它出版物完整并入作为参考。如果在本节中陈述的定义与在并入本文作为参考的专利、申请、公开的申请和其它出版物中陈述的定义相反或不一致,则在本节中陈述的定义优先于在并入本文作为参考的专利、申请、公开的申请和其它出版物中陈述的定义。

对出版物或文献的引用不是意在认可任意这样的出版物或文献为相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文献的内容或日期的认可。

本文使用的“一个(种)”是指“至少一个(种)”或“一个(种)或多个(种)”。

本文使用的术语“个体”不限于具体的物种或样品类型。例如,术语“个

体”可以指的是患者，并且通常指的是人类患者。然而，该术语不限于人类，因此涵盖各种哺乳动物物种。

本文使用的“治疗”是指其中病症、紊乱或疾病的症状得以改善或有益改变的任意措施。治疗也涵盖本文组合物的任意药学使用。

本文使用的术语“评估”指的是任意形式的测量，并且包括确定要素(element)是否存在。术语“评估”、“确定”、“测量”、“评价”和“测定”可互换使用，并且既包括定量确定也包括定性确定。因此，术语“评估”既涵盖确定某物的存在量，也涵盖确定其是否存在。

本文使用的术语“血小板反应性”指的是在对损伤和/或化学刺激物的应答中血小板的活化。血小板聚集是对血小板反应性的最常见测量。因此，本文使用的术语“血小板反应性”宽泛地指在对血小板活化剂(例如 ADP、凝血酶、胶原等)的应答中血小板的聚集。

本文使用的术语“药物洗脱支架”或“DES”指的是通常由金属或复合材料制成的支架(即可张开的架)，所述支架涂覆有已知可干扰再狭窄(动脉的再阻断)过程的药物。该术语不限于任意具体的药物洗脱支架。例如，其涵盖 CYPHER™西罗莫司洗脱支架(Cordis)、TAXUS™紫杉醇(paclitaxel)洗脱支架(Boston Scientific)、ENDEAVOR™ ABT-578 洗脱支架(Medtronic)、XIENCET™依维莫司(everolimus)洗脱支架(Abbott)等。

本文使用的术语“支架血栓形成”被定义成如 Academic Research Consortium(ARC)(Mauri, et al., N. Engl. J. Med.(2007)356:1020-1029)所提出的那样。所述 ARC 定义包括具有“确定的”、“很可能的(probable)”和“可能的(possible)”支架血栓形成的患者。当通过血管造影术得以确认时或当对急性血栓形成作出病理确认时，将支架血栓形成定义为“确定的”。将“很可能的”支架血栓形成定义为 30 天内的不明原因的死亡，或定义为在血栓形成没有血管造影确认的情况下靶血管的心肌梗塞(MI)。将“可能的”支架血栓形成定义为 30 天后的不明原因的死亡。本文使用的“急性”支架血栓形成指的是在经皮冠状动脉介入(PCI)的 24 小时内发生的支架血栓形成；“亚急性”支架血栓形成指的是在 PCI 后的 1 至 30 天内发生的支架血栓形成；以及“迟发性”支架血栓形成指的是晚于 PCI 后的 30 天发生的支架血栓形成。

如上所述，本发明的一个实施方案提供了测量用 DES 治疗的个体的血

小板反应性的方法。另一个实施方案提供了识别那些用 DES 治疗而处于支架血栓形成风险中的个体的方法。另一个实施方案提供了测量在用 DES 治疗的个体中的氯吡格雷诱导的对血小板的抑制作用的方法。

在本发明的各种实施方案中，在测量全血样品中 P2Y₁₂ 拮抗剂(诸如噻吩并吡啶)对血小板聚集的抑制作用中将 ADP 和 PGE₁ 的组合物用作活化剂。因此，前述组合物可用于确定涉及用噻吩并吡啶对患者进行治疗的抗血小板疗法的有效性。上述组合物可与如下物质联用：涂覆有 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒和对噻吩并吡啶的效力进行测定所需的任意其它试剂。可使用冻干的试剂组合物，所述组合物包含上述活化剂组合物和颗粒。在一种措施中，将待测量的计量体积的样品(例如全血)与所述冻干的试剂机械混合。监测光透过(light transmission)的变化，并计算血小板活性指数。在一个方面，将全血样品与前述冻干的试剂在小容器(cuvette)或组合筒(unitized cartridge)中混合。可使用装置来进行所述测定。所述装置包含用于接受所述样品的孔，其中所述孔含有所述冻干的试剂和用于进行所述测定的其它试剂。所述其它试剂可以是各种缓冲液和/或冻干稳定剂。

如上所述，本发明的一个方面涉及对全血样品进行血小板功能活性测定的方法。在一个实施方案中，所述样品是已经被 5-磷酸-腺苷(ADP)拮抗剂影响的样品。例如，所述样品可来自用 5-磷酸-腺苷(ADP)拮抗剂进行治疗的患者。就本发明而言，在测定介质中提供组合，其中所述组合包含 ADP 和 PGE₁ 的组合物和所述样品。通常，ADP 的最终浓度为 2 至 35 μ M，优选为 15 至 20 μ M，以及 PGE₁ 的最终浓度为 2 至 30nM，优选为 20 至 25nM。

本发明方法还使用了包含涂覆有如下化合物的颗粒的试剂，所述化合物可导致血小板的特异性凝集，即血小板由于血小板上的受体和颗粒上的化合物之间的特异性相互作用而凝集。所述化合物包括(为了说明而非限制)针对血小板受体的抗体和 GPIIb/IIIa 受体配体，所述化合物可以是与血小板表面上的 GPIIb/IIIa 受体结合、络合或相互作用的小的有机分子、多肽、蛋白质、单克隆抗体或核酸。当血小板表面上 GPIIb/IIIa 受体与颗粒上的 GPIIb/IIIa 受体配体结合、络合或相互作用时，导致血小板介导的颗粒聚集。典型的 GPIIb/IIIa 配体包括血纤蛋白原、单克隆抗体 10E5(Colter, et al., J. Clin. Invest.(1983)72:325)、单克隆抗体 c7E3(The EPIC Investigators, N.E. Journal of

Med.(1994)330:956)、冯维勒布兰德因子、纤连蛋白、玻连蛋白和具有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的其它配体或模拟该序列的其它肽或仿肽(peptidomimetic)(Cook, et al., Drugs of the Future(1994)19:135)。其它重要的化合物包括凝血酶抑制剂、低分子量肝素等。

所述化合物所附着的颗粒为至少约 0.1μ ，并且不大于约 20μ 。在一个实施方案中，所述颗粒为约 0.1μ 至约 10μ 。在另一个实施方案中，所述颗粒为至少约 1μ ，并且小于约 8μ 。所述颗粒可实际上是任意形状，但通常为具有均匀直径的球形。所述颗粒可具有任意密度，但优选具有接近水的密度，通常为约 0.7 至约 1.5g/ml 。所述颗粒可在表面上带有或不带有电荷，所述电荷可以是正电荷或负电荷，优选为负电荷。所述颗粒被功能化或是可功能化的，从而被动地将上述部件(member)直接或间接地结合或附着在它们表面上。

所述颗粒可以是固体(例如由有机和无机聚合物或胶乳构成)、小油滴(例如烃、氟碳化合物、有机硅(silicon)流体)或小囊泡(例如合成囊泡诸如磷脂囊泡或天然囊泡诸如细胞(cell)和细胞器(organelle))。所述固体颗粒通常为聚合物(加聚物或缩聚物)，其在液体介质中是可容易分散的。可悬浮颗粒(suspendable particle)的实例为聚合物材料例如胶乳、脂质双层、小油滴、细胞(cell)和水凝胶。其它颗粒组分包括聚合物，例如硝化纤维素、乙酸纤维素、聚氯乙烯、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯(盐)、聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯(盐)、聚对苯二甲酸乙二酯、尼龙、聚丁酸乙烯酯、多糖(例如葡聚糖和改性葡聚糖)等；它们可单独使用或与其它材料联用。所述固体颗粒可由以下物质构成：聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、丙烯酸酯(盐)衍生物(特别是酯和酰胺)和甲基丙烯酸酯(盐)衍生物(特别是酯和酰胺)的均聚物和共聚物、硅氧烷等。

如上所述，将所述化合物涂覆在所述颗粒上。通常，所述化合物被动地与颗粒结合。这样的被动结合可通过一般可在文献中得到的公知技术来完成。参见例如 Immobilized Enzymes, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York(1978)和 Cuatrecasas, J. Biol. Chem.(1970)245:3059。简言之，如上所述，颗粒的表面可以是多功能的或可被多功能化。很多种官能团是可用的或可被引入。官能团包括羧基、醛基、氨基、氰基、亚乙基(ethylene group)、羟

基、巯基等。使很多种化合物与表面连接的方式是公知的并在文献(参见如上)中得以充分的说明。侧部件的连接可通过键来直接实现或通过居间的连接基来间接实现。连接基的长度可变化很大,这取决于侧部件的性质和颗粒的性质。

在化合物分子与颗粒的连接中控制化合物分子与颗粒的比例。在一种方法中,可通过对引入到颗粒表面上的位点的数目进行调整来控制颗粒表面上的经官能化的所述位点的数目。可选择地或与上述方法结合,可通过对所述化合物在用于连接的反应介质中的浓度进行调整来控制化合物分子与颗粒的比例。鉴于上述教导,其它方法对于本领域技术人员是显见的。

本发明使用的颗粒试剂可以用足量的物质处理以阻断颗粒上的吸附区域。所述物质不会影响颗粒就它们在本发明中的预期目的而言所发挥的功能。所述阻断物质包括蛋白质(例如牛血清白蛋白、牛血清丙种球蛋白等)、多糖(例如葡聚糖等)等。在可与上述方法联用的另一种方法中,使用如下颗粒,其中经官能化的用于连接的位点的数目基本上减少了颗粒表面上的吸附区域。

所述颗粒通常包含标记物(label),其附着在所述颗粒上或结合在所述颗粒中。所述标记物可以是可用于检测目的的任何部分(moiety)。所述标记物常常是信号产生系统(signal producing system)的部件。所述标记物能够被直接或间接地检测。所述标记物可以是同位素的或非同位素的,通常是非同位素的,并且可以是染料、荧光分子、化学发光分子、催化剂(例如酶)、对催化剂进行编码的多核苷酸、启动子、辅酶、酶底物、放射性基团、小的有机分子、可扩增的多核苷酸序列等。

在本发明的一个具体的实施方案中,所述颗粒含有一种或多种在红外线上有吸收的染料。这样的染料包括菌绿素(bacteriochlorin)、细菌叶绿素(bacteriochlorophytin)、meropolymethine dye、苯并轮烯类(benzoannulene)、插烯的卟啉(vinylogous porphyrin)、多次甲基染料(polymethine dye)、花青(cyanine)和部花青(merocyanine)等。重要的具体染料是四叔丁基-四(二甲基氨基)-29H-31H-酞菁铜(II) (copper(II)-tetra-tert-butyl-tetrakis(dimethylamino)-29H-31H-phthalocyanine)和四叔丁基-四(二甲基氨基)-29H-31H-酞菁氧钒

(vanadyl-tetra-tent-butyl-tetrakis(dimethylamino)-29H-31H-phthalocyanine)。所选择的具体染料具有便利、可用、稳定、与所述颗粒相容等性质之一。可通过聚合或被动吸附而将这些染料直接引入到颗粒本身中。所述染料可以是逐一负载的(即顺序负载)或是组合负载的(即同时负载)。可选择地,所述染料可与连接组分一起与珠子连接,从而使它们不会从表面渗出。不论使用哪种负载方法,条件是颗粒表面就在合适条件下凝集的能力而言是不受影响的。

所述染料吸收在约 750-900nm 的红外线范围内特别是在约 750-850nm 的范围内的光。对于具有高水平红细胞的样品来说,所述光为约 $800\pm 10\text{nm}$, 其对于氧合血红蛋白和还原血红蛋白来说是等吸光点。与颗粒一起使用的染料的量随染料在重要光范围(light range)内的消光系数、测定所需的灵敏度、颗粒的尺寸、染料与颗粒的结合模式、染料与颗粒基质的相容性等而变化。通常,所结合的染料的量其范围为约 1 至 20%重量,更常见是 5 至 15%重量。在本发明中具有具体用途的染料是酞菁。不含金属的酞菁在约 700nm 处有吸收($\epsilon=162,000$)。与不含金属的酞菁相比,金属络合物使吸收移向较短的波长或较长的波长,大多数金属使吸收移向非常较短的波长,但是一些金属(例如铅)在非常较长的波长处有吸收。

过渡金属和酞菁形成的络合物(金属酞菁(metallophthalocyanine)和 metallonaphthalocyanine)化学上对光和热是非常稳定的。它们通过在合适金属的存在下对邻苯二甲腈进行缩合来形成。用于形成所述金属酞菁的一些金属除铜(Cu)和钒(V)外还有镁(Mg)、锌(Zn)和钴(Co)。

在本发明的一个具体的实施方案中使用具有平坦最大吸收值的羧化微粒。这些微粒通过结合在 805nm 处附近具有不同最大吸收值的多种染料来制备。这得到跨越宽范围波长(780-820nm)的平坦最大吸收谱。

所述样品可以是待分析的任意溶液(合成的或天然的),其中所述样品已经接受 P2Y₁₂ 拮抗剂(特别是噻吩并吡啶)(其可能与阿司匹林联用)的作用。术语样品包括来自宿主的生物组织(包括体液)等。可直接对所述样品进行检查,或可如通常那样对其进行预处理。本发明具体用于包含血小板的样品,所述样品包括体液例如全血、含有血小板的血液组分例如血浆等。在一个实施方案中,本发明具体用于全血样品。所述样品的量取决于所述样品的

性质。就流体样品例如抗凝化全血(whole anticoagulated blood)而言,所述样品的量通常为约 $30\mu\text{l}$ 至 5ml , 优选为约 100 至 $300\mu\text{l}$ 。术语“样品”包括直接来自患者的未经加工的样品或已在任意便利的液体介质(通常是含水介质(例如含有枸橼酸钠的含水介质))中经预处理和制备的样品。

优选地,本发明用于进行所述测定的介质是含水介质。其它极性共溶剂也可用在介质中,其通常是具有 $1-6$ 个碳原子的氧合有机溶剂(oxygenated organic solvent),更通常是具有 $1-4$ 个碳原子的氧合有机溶剂,包括醇、醚等。通常,所述共溶剂以小于约 70% 重量的量存在,更通常以小于约 30% 重量的量存在。此外,在本发明方法中常常使用各种辅助物质。例如,缓冲剂一般存在于测定介质中,以及存在有针对测定介质和测定组分的稳定剂、表面活性剂(特别是非离子型表面活性剂)、结合增强剂(例如聚亚烷基二醇)等。

所述介质的 pH 通常在约 2 至约 11 的范围内,优选为约 4 至约 9 。可使用各种缓冲液以实现所期望的 pH 并且在所述方法中维持所述 pH。示例性缓冲液包括 HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液、巴比妥(barbital)缓冲液等。所使用的具体缓冲液就所述方法而言不是至关重要的,但一种缓冲液在某些情况下与其它缓冲液相比可能是优选的。在一些情况下,HEPES 是优选的,并以约 0.05M 至约 1mM 的浓度存在,但通常以约 0.01M 的浓度存在。

测定介质的体积为约 $25\mu\text{l}$ 至约 $500\mu\text{l}$, 通常为约 $75\mu\text{l}$ 至约 $250\mu\text{l}$ 。所述测定可在任意合适的容器中进行。便利地,所述容器为小容器或筒,其与进行所述测定并对测定结果进行测量的设备一起使用。所述反应容器通常含有本发明的呈干燥冻干形式的活化引发剂及其它试剂(例如颗粒试剂等)、稳定剂等。

将样品和颗粒试剂的组合在适于使颗粒凝集的条件下培养。通常使用适于进行所述方法的温度。所述温度可以是恒定的或可以是变化的。通常,在反应步骤中使用恒定的温度。所使用的温度通常为约 10 至约 80°C , 更通常为约 15 至约 45°C , 优选地,所述温度应为至少 25°C , 更优选在约 30 至约 40°C 的范围内,通常约为 37°C 。

确定颗粒的凝集程度,且所述程度与样品中 P2Y₁₂ 拮抗剂的存在和/或

量相关。凝集的存在可通过观察颗粒的聚集(clumping)而视觉确定,其中颗粒的聚集可表明凝集。优选地,如上所述,可对颗粒进行着色以有助于使基质的凝集或聚集可视化。凝集的程度可通过观察介质的光密度(optical density)的变化率以分光光度法(spectrophotometrically)、浊度法(turbidimetrically)、比浊法(nephelometrically)等来测量。

在本发明的一个具体的实施方案中,对来自用噻吩并吡啶进行治疗的患者的全血样品进行血小板功能活性测定。将所述样品在合适的容器(例如反应小容器)中与ADP和PGE1的组合物及涂覆有血纤蛋白原的颗粒混合以形成测定介质。颗粒试剂的颗粒具有结合在其中的一种或多种红外线染料。使所述组合经受有助于凝集的条件,并且所述介质用红外线照射。确定红外线在测定混合物中的透过性,其中透过水平与血小板反应性相关。

选择在约800nm处具有高吸收的凝集介质。凝集介质吸收系数和全血吸收系数之间的比例在800nm处应该优选大于约4:1。就具体测定而言的吸收比例既是凝集介质吸收系数的函数,又是测定样品中凝集介质浓度的函数。

所述样品与所述试剂混合后,期望的是将其加热至高于室温但低于会妨碍测定的温度,从而保证温度可被控制而不会不利地影响测定结果。期望的是,温度应该是至少25°C,优选在30-40°C的范围内,更优选为约37°C。当将所述试剂与所述样品混合时在反应期间,通常对反应介质进行温和的搅拌。搅拌程度足以实现和保持测定样品的均匀性。从零时间(混合时间)起的读数总时间其范围可为约10秒至10分钟,更常见的是约30秒至8分钟,以及优选为约30秒至3分钟。可通过任意便利的手段特别是使用可处理与校准试验(calibrator)和/或对照试验(control)有关的数据的算法来分析数据。

凝集水平是所测试样品的血小板反应性的指标。凝集水平可与已知血小板反应性的标准试验(standard)进行比较。通常,结果可与校准试验进行比较,所述校准试验可伴随进行或先前已经进行或可按标准曲线的形式提供。在用药物洗脱支架(DES)治疗的个体中,血小板反应性可用于评估出院后不利后果(adverse post-discharge outcome)(包括支架血栓形成)的可能性。

本发明方法可与用于血小板计数(platelet count)的测定联用,所述用于

血小板计数的测定例如描述在美国专利申请 09/177,884(1998 年 10 月 23 日提交)和国际申请 PCT/US 1999/24670(1999 年 10 月 20 日提交)(公开号为 WO/2000/025140)中, 将这些申请的相关公开内容并入本发明作为参考。

上述测定可优选在装置中进行, 所述装置允许本发明的反应发生并且测量其结果。所述设备应该基于活化的血小板与血纤蛋白原结合的能力而评估血小板的功能。当活化的血小板与涂覆有血纤蛋白原的颗粒结合并使其凝集时, 透光率增加。一般而言, 对测定结果进行测量的设备是可对凝集进行测量的设备。优选地, 所述设备测量由凝集导致的光信号变化。合适的设备包括(用于说明而非限制)动态分光光度计(kinetic spectrophotometer)即 VERIFYNOW™ System 设备(从 Accumetrics, Inc., San Diego, CA 购得并用于对正常的样品进行快速的血小板功能活性测量)等。

VerifyNow™ System 设备是基于浊度计量的光学检测系统, 其将血小板诱导的聚集测量为透光率的增加。所述系统包括分析仪、一次性筒和控制器(control)。所述筒含有基于微粒凝集技术的试剂。所述质量控制系统包括电子控制器、两级测定“湿”控制器(two levels of assayed “wet” control)(WQC)、筒内(in-cartridge)湿度传感器、包装内(in-packaging)湿度指示器和用于两个测定通道(assay channel)同时发生的测试器(test)。所述分析仪对测定顺序进行控制、建立测定温度、控制试剂-样品在所需持续时间内的混合、确定血小板功能的程度、显示结果和进行自检。为了用在本发明方法中, 所述系统的测试筒含有冻干的制剂, 所述制剂包含 ADP 和 PGE1 的组合物、具有被动结合的 GPIIb/IIIa 受体配体的颗粒和缓冲液。来自患者的样品通常为枸橼酸盐化的全血(citrated whole blood), 其被分析仪自动从血液采集管中分配到所述筒中而无需使用者进行任何血液操作。相互作用通过颗粒的红外线吸收特征来监测。当所述颗粒与血小板相互作用时, 颗粒的凝集通过 VerifyNow™分析仪的光学系统来测量。所述凝集被检测为红外线在所述样品中透过率的增加。对反应动力学(reaction kinetics)进行分析并转化成“P2Y12 应答单位”(PRU)。

本发明的另一个实施方案是一种试剂盒, 所述试剂盒在包装的组合中包括冻干的制剂, 所述冻干的制剂包含 ADP 和 PGE1 的组合物、具有被动结合的血纤蛋白原的颗粒和缓冲液。所述冻干的制剂可存在于反应容器(例

如在分析设备中使用的筒)中。对于上述 VerifyNow™ System, 可将所述冻干的制剂置于在分析仪中使用的四孔筒的外孔中。所述试剂盒也可包括样品采集容器和/或用于进行本发明方法的装置。试剂的相对量可变化很大以提供所述试剂在溶液中使测定灵敏度基本上最佳的浓度。

当合适时, 可将所述试剂置于气密的包装中, 以便保持任意试剂的活性。所述包装可以是例如由湿气基本上不能透过的材料制成的袋、囊(pouch)等。所述材料包括(示例而非限制)塑料、铝箔等。对于血液样品, 所述试剂盒还可包括用于刺入人体皮肤的物品、消毒剂或灭菌垫(sterilizing pad)等。所述试剂盒也可包括校准品和标准品。另外, 所述试剂盒也可包括一种或多种用于进行血小板计数测定的试剂。

所述试剂盒可包括进行本发明测定所需的试剂。在一个实施方案中, 所述试剂盒包括血液小瓶、使所评估的血液样品的 pH 和盐浓度保持在适于血小板介导的固体表面的凝集的范围内的缓冲液和涂覆有血小板 GPIIb/IIIa 受体配体的小的聚合物珠子。所述缓冲液可呈溶液形式, 或可仅由缓冲组合物和盐构成, 向所述缓冲组合物和盐中加入已知量的水以得到期望的缓冲溶液。任选地, 所述试剂盒也可包含抗凝剂。在一个实施方案中, 所述缓冲液是 HEPES; 所述抗凝剂是枸橼酸盐; GPIIb/IIIa 受体配体是血纤蛋白原; 小的聚合物珠子是聚丙烯腈或羧化聚苯乙烯, 其中肽 GPIIb/IIIa 受体配体(例如血纤蛋白原)通过所述肽和珠子表面上的官能团之间的疏水性相互作用和/或氢键相互作用而被动地与珠子表面结合。在另一个实施方案中, 所述试剂盒还包含血小板活化剂, 例如 ADP 和 PGE1 的组合物。

在本发明的一个实施方案中, 在经历 PCI 的接受 DES 的患者中使用护理时测试(point-of-care testing)来确定以下关系即对氯吡格雷的应答、治疗后的反应性(其如下定义: 血小板功能相对于基线的抑制百分比或通过 PRU 测量的绝对反应性)和有害事件之间的关系, 其中在出院前采集血液样品。

在另一个实施方案中, 可考虑在体重超过约 100kg 的具有 DES 的 PCI 患者中增加氯吡格雷的剂量。对 PCI 时的血小板功能进行的护理时测试可识别在 30 天随访中处于支架血栓形成高风险中的患者。处于风险中的患者可受益于增加的氯吡格雷给药方案或受益于可选择的抗血小板策略(例如普拉雷格(prasugrel))。

实施例

下述实施例意在说明本发明而不是意在限制其范围。除非另有说明，份和百分比为重量份和重量百分比。

实施例 1

用最终浓度分别为 20 μ M 和 22nM 的 ADP(Chrono-log Corp., Havertown, PA)和 PGE1(SIGMA)进行剂量-应答测试。将 ADP 在 HEPES/Saline(pH 7.4)缓冲液中稀释至最终浓度为 200 μ M, 之后在集合度计(aggregometer)上使用。将 PGE1 在 HEPES/Saline(pH 7.4)缓冲液中稀释至最终浓度为 220nM, 之后在集合度计上使用。将 P2Y12 受体拮抗剂在 DMF 中稀释至最终浓度为 1mM、2mM 和 5mM。

将 5 微升稀释的 P2Y12 拮抗剂加入(spike)到 5mL 全血中。将样品倒转并在室温培养 1 小时。全血基线样品没有接受任何添加剂。培养结束后, 对于富含血小板的血浆(PRP), 将全血样品以 1500rpm 旋转 15 分钟, 以及对于缺乏血小板的血浆(PPP), 将全血样品以 3500rpm 旋转 15 分钟。对于使用 PPP 的每种样品, 将血小板计数调整至约 250,000 个/ μ L。

对于集合度测定, 将 450 μ L 经调整的 PRP 加入到玻璃小容器中。空白样品含有 450 μ L PPP 和 50 μ L HEPES/Saline 缓冲液。将 200 μ M ADP 和 220nM PGE1 的 50 微升组合物加入到每种 PRP 样品中, 并在集合度计上测试 10 分钟。

如图 1 所示, 上述试剂和系统成功地检测了来自用 P2Y12 拮抗剂处理的血液样品的血小板聚集程度。图 1 和 2 分别说明了一名个体的平均应答和五名个体的平均应答。

从上述图 1 说明的结果中显而易见的是, 本发明提供了一种简单快速的方法来对已经通过暴露于 P2Y12 拮抗剂而被影响的样品进行血小板活性测定。

实施例 2

对 PCI 患者进行了研究。所选择的患者具有至少一种如下情况: 至少一处需要 PCI 的损伤 \geq 50%直径的狭窄、直径在 2.25 和 4.0mm 之间的参考脉管(reference vessel)、位于天然冠状动脉或旁路移植植物(bypass graft)中的新形成或再狭窄的靶标损伤和对阿司匹林、氯吡格雷或 DES 的任意组分没有已

知的变态反应。

全血在抗凝剂治疗或抗凝血酶治疗前以及通过在 PCI 后的 12 小时进行的放血术(phlebotomy)得自动脉套管的侧口(side port)。使用 VerifyNow™ P2Y12 测定(Accumetrics, Inc., San Diego, Calif.)来测量氯吡格雷的抑制作用。在患者中由氯吡格雷诱导的抑制作用占在氯吡格雷暴露前基线样品的百分比使用如下公式来计算： $1 - (\text{氯吡格雷后 PRU} / \text{PRU 基线}) \times 100$ 。

如果氯吡格雷治疗后的 ADP 诱导的聚集大于基线，则认为抑制百分比为零。在没有氯吡格雷暴露前的基线样品的患者中(即在 PCI 前接受慢性氯吡格雷治疗的患者)，使用通过设备(使用内部参考通道)报道的抑制百分比。

所有患者在所述操作(procedure)的当天接受 325mg 未包衣的阿司匹林而不考虑先前是否使用阿司匹林。先前没有服用氯吡格雷的患者在所述操作结束时用 600mg 负荷剂量治疗，然后离开导管插入实验室。在所述操作期间给予操作中的肝素(具有>250 秒的目标活化凝结时间(goal activated clotting time))或比伐卢定(bivalirudin)，这由操作者决定。指示患者无限期(indefinitely)服用阿司匹林 325mg/天，以及历时最短 3 个月服用氯吡格雷 75mg/天。从分析中排除接受糖蛋白 IIb/IIIa 抑制剂的患者或在所述操作前的 24 小时内已经接受负荷剂量的氯吡格雷的患者。

将“高治疗后反应性(high post-treatment reactivity)”定义为当进行氯吡格雷治疗(进行慢性治疗或负荷剂量后的 12 小时)时绝对 PRU 的最高四分位(highest quartile)，而将“氯吡格雷无应答性”定义为血小板功能抑制百分比(与患者的基线或参考通道相比血小板反应性在氯吡格雷治疗后的相对变化)的最低四分位(lowest quartile)。如果患者的稳态模型评估指数(Homeostasis Model Assessment index)(计算为[禁食情况下的胰岛素($\mu\text{U}/\text{mL}$)]*[禁食情况下的葡萄糖(mg/dl)]/405)>3.0，或如果患者患有需要药物疗法的糖尿病，则所述患者被判断是胰岛素抗性的(insulin resistant)。

所测量的临床终点(clinical endpoint)为死亡、MI(非 Q 波和 Q 波)和支架血栓形成。将围操作期的(peri-procedural)非 Q 波心肌梗塞(MI)定义为在没有病理性 Q 波的情况下 CK-MB 大于正常上限的 3 倍。将 30 天随访期内的 MI 定义为临床事件委员会认为是缺血所致的心脏酶(cardiac enzyme)的任意升高。将“支架血栓形成”定义为下述任意情况：支架闭合或血栓的血管造影

显示(demonstration)、无法解释的猝死和无患者支架伴随记录(concomitant documentation)的 MI。将“急性血栓形成”定义为在 PCI 的 24 小时内发生的血栓形成,以及将“亚急性血栓形成”定义为在 24 小时和 30 天随访之间发生的血栓形成。

基于计算机的分析程序 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences, 12.0 for PC, SPSS Inc., Chicago, Ill.)用于统计学计算。 χ^2 检验(chi-square test)或费氏确切检验(Fisher exact test)(此时就 2×2 表格而言任意期望的细胞计数(any expected cell count)<5)用于检测分类变量(categorical variable)的差异;认为 $p < 0.05$ 是具有显著性的。使用斯氏 t-检验(Student t-test)来对连续变量(continuous variable)进行比较。进行单变量逻辑回归分析和向前条件法(forward conditional)(准入标准(entry criteria)为 0.05 以及准出标准(exit criteria)为 0.10)多变量逻辑回归分析来识别与氯吡格雷无应答性独立相关的特征或变量。

检验下述变量并且如果单变量分析的 p 值 > 0.10 则进入到多变量分析中,所述变量为年龄、性别、体重、体重指数(BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ 、糖尿病史、胰岛素抗性、CHF 史、MI 史、HTN 史、当前吸烟、肾功能不全(肌酸酐 ≥ 1.5)、EF $< 40\%$ 、表现出 MI、表现出心绞痛(angina)、使用比伐卢定和先前使用阿司匹林、 β 阻断剂或阿托伐他汀。

基线临床特征如下面表 1 所示。

表 1	
	N=280
平均年龄(岁)	68±11
男性	213(76%)
糖尿病	75(27%)
CHF 史	28(10%)
先前 MI	82(29%)
当前吸烟者	28(10%)
体重(kg)	89.5±24.9
体重指数(kg/m ²)	29.8±7.8
医药治疗	
慢性阿司匹林	242(86%)
慢性氯吡格雷	101(36%)
β 阻断剂	171(61%)

操作的适应症通过如下情况之一来确定:在 261 名患者(93%)中有稳定型心绞痛(stable angina)或缺血(ischemia),在 13 名患者(4.8%)中有不稳定型心绞痛(unstable angina),在 6 名患者(2.2%)中有急性 MI。

损伤特征列于表 2 中。

表 2	
	N=454
损伤长度(lesion length)	19.9mm
TIMI 前的 0-2 级流动(pre-TIMI grade 0-2 flow)	8.6%
损伤分数 B2/C(lesion score B2/C)	66%
慢性完全阻塞(chronic total occlusion)	4.8%
分叉损伤(bifurcation lesion)	16%
隐静脉移入物(saphenous vein graft)	6.6%
未经保护的 LMCA	1.1%

操作特征列于表 3 中。

表 3	
	N=454
所治疗的损伤数目	1.7±0.8
所治疗的脉管数目	1.4±0.6
支架长度(mm)	30.1±20.2
支架数目/损伤	1.5±0.8
平均支架直径(mm)	2.9±0.3
TIMI 后的 0-2 级流动(post-TIMI grade 0-2 flow)	0.6%
支架后的 IVUS 指导(IVUS guidance post-stent)	13%
进行旋磨术(rotablator)	1.5%
使用比伐卢定	41%

将抑制百分比<10%定义为氯吡格雷无应答性。氯吡格雷无应答性的单变量预测因素为表现出 MI(p=0.03)、糖尿病史(p=0.03)、在最高四分位中的体重(>100kg, p=0.03)和使用 β 阻断剂(p=0.001)。

氯吡格雷无应答性的多变量预测因素列在表 4 中。

变量	优势比(置信区间)	p 值
表现出 MI	6.8[95%1.1 至 41.5]	0.038
体重*	2.0[95%1.1 至 3.8]	0.033
使用 β 阻断剂	2.5[95%1.3 至 4.9]	0.006

*体重的最重四分位>100kg。

在 30 天随访时的支架血栓形成报道在表 5 中。

表 5	
	N=280
Clop NR	p=0.046
高 Rx 后反应性(high post-Rx reactivity)	p=0.06
Clop NR+高 Rx 后反应性	p=0.02

在多名患者中发现支架血栓形成。所有患者在血栓形成时正在接受双重抗血小板治疗。1 号患者在 PCI 后的 80 分钟患上急性血栓形成，并且在所述操作时正在接受氯吡格雷治疗。就 1 号患者而言的抑制百分比为 0%。2 号患者在 PCI 后的 6 天患上亚急性血栓形成，并且在所述操作时正在接受

氯吡格雷治疗。就2号患者而言的抑制百分比为0%。3号患者在PCI后的34天患上亚急性血栓形成，并且在所述操作时首次(naive)接受氯吡格雷治疗且用600mg负载。就3号患者而言的抑制百分比为0%。4号患者在PCI后的8天患上亚急性血栓形成，并且在所述操作时首次接受氯吡格雷治疗且用600mg负载。就4号患者而言的抑制百分比为44%。所有四名具有血栓形成和无应答的患者处于绝对氯吡格雷后反应性的最高四分位中。

在这个实施例中，进行PCI的患者中的四分之一具有氯吡格雷诱导的对血小板的抑制作用(将其定义为<10%(通过护理时测定(point-of-care assay)来测量))。表现出MI的患者具有较重的体重，并且 β 阻断剂的使用独立地与氯吡格雷无应答性相关。在30天的随访中氯吡格雷无应答显著地与支架血栓形成相关，特别是在高绝对治疗后反应性的情况下。

从这个实施例中注意到的是，就大于100kg的患者而言应该增加氯吡格雷的给药。相应地，在PCI时对血小板功能进行的护理时测试可用于识别在30天的随访中处于支架血栓形成高风险中的患者。处于风险中的患者可受益于增加的氯吡格雷给药方案或受益于可选择的抗血小板策略(包括但不限于普拉雷格等)。

实施例3

进行另一项研究以确定在接受氯吡格雷治疗的患者中的血小板反应性(通过VerifyNow™ P2Y12测定(Accumetrics, Inc., San Diego, CA)来评估)是否与植入药物洗脱支架(DES)后的出院后结果(包括支架血栓形成)相关。这项研究发表在Price, et al., Eur. Heart J.(2008)29(8):992-1000中，将其完整引入本文。

如果患者具有至少一处需要PCI的损伤 $\geq 50\%$ 直径的狭窄并且对阿司匹林、氯吡格雷或西罗莫司洗脱支架(SES)没有已知的变态反应，则所述患者有资格应征。正在接受氯吡格雷治疗的患者或没有接受过氯吡格雷治疗的患者都有资格包括在其中。然而，为了保证在所述操作前接受氯吡格雷治疗的患者在血小板功能评估时被最佳且一致地治疗，仅包括那些在所述操作前的至少12小时已经接受600mg负荷剂量的患者或那些接受氯吡格雷75mg/天的维持剂量超过5天的患者。在围操作期接受糖蛋白抑制剂的患者由于干扰P2Y12测定而没有征集。

在 PCI 和就没有接受过氯吡格雷治疗的患者而言的 600mg 氯吡格雷负荷剂量后的 12 小时,在接受先前氯吡格雷治疗的患者中,在抗凝剂治疗前,在导管插入术时,以及通过放血术,从动脉套管的侧口得到全血。将血液置于含有 3.2%枸橼酸钠的 1.8mL 拉伸塑料 Vacuette®管(Greiner, Monroe, NC)中。

使用 VERIFYNOW™ P2Y12 测定(Accumetrics, Inc.)来测量氯吡格雷的抑制作用。VerifyNow™ P2Y12 是基于筒的快速血小板功能测定,其用于直接测量药物对 P2Y12 受体的作用。所述测定含有 20mM ADP 和 22nM 前列腺素 E1 以减少 ADP 与 P2Y1 受体的结合所致的活化贡献。涂覆有血纤蛋白原的微粒在 VerifyNow™ P2Y12 筒中用于与可得到的血小板受体结合。所述 VerifyNow™装置将血小板诱导的聚集测量为透光率的增加,并使用专有的算法来报道单位为 P2Y12 反应单位(PRU)的值。在此测定中,较高的 PRU 反映了较大的 ADP 介导的血小板反应性。已经报道在患有冠状动脉疾病的患者中测试精确度的平均变化系数为 3.2%。

介入策略由操作者决定。在所述操作期间使用操作中的未分级肝素(具有>250 秒的目标活化凝结时间)或比伐卢定。所有患者接受 SES,并且他们在所述操作的当天接受 325mg 阿司匹林而不考虑先前是否使用阿司匹林。先前没有接受过氯吡格雷治疗的患者在所述操作结束时接受 600mg 负荷剂量,然后离开导管插入实验室。已经接受氯吡格雷治疗的患者(如前面的包括/排除标准所示)没有接受额外的负荷剂量。指示患者无限期服用阿司匹林 325mg/天,以及历时操作后的最短 3 个月服用氯吡格雷 75mg/天。

将“治疗后的血小板反应性”定义为氯吡格雷的 PRU(在 PCI 和就先前没有接受过氯吡格雷治疗的患者而言的 600mg 负荷剂量后的 12 小时或在已经接受氯吡格雷治疗的患者中在 PCI 前在导管插入术时)。将“技术成功(technical success)”定义为最终直径狭窄≤30%和心肌梗塞溶栓(TIMI)流动等级为 3。所测量的临床终点是心血管(CV)死亡、非致死性心肌梗塞(MI)和支架血栓形成。将“随访中的 MI”定义为在与心脏缺血相符的临床征候或症状的情况下心脏生物标志的任意典型升高和降低,其按照 American College of Cardiology 的定义(Cannon, et al., J. Am. Coll. Cardiol.(2001)38:2114-2130)。Academic Research Consortium 的定义用于“支架血栓形成”(确定的、很可能

的和可能的)(Mauri, et al., N. Engl. J. Med.(2007)356:1020-1029)。将“亚急性支架血栓形成”定义为出院后至 30 天随访时发生的支架血栓形成,以及将迟发性支架血栓形成定义为在 30 天随访和 6 个月随访之间发生的支架血栓形成。

基于计算机的分析程序 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences, 12.0 for PC, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)用于统计学计算。对具有和不具有噻吩并吡啶治疗的支架植入进行的随机研究已经显示与单独的阿司匹林相比在用双重抗血小板疗法进行治疗的患者中心脏事件相对减少 75-85%。本发明人估计,假设应答者中的事件率为 1.0%和氯吡格雷无应答率为三分之一,则 380 名患者的样本大小就使用单向费氏确切检验(Fisher's exact test)来检测事件率的 80%相对差异而言可提供 70%的效力(power)。使用斯氏 t-检验来对连续变量进行比较。 χ^2 检验用于检测分类变量的差异,以及当就 2×2 表格而言任意期望的细胞计数<5 时,使用费氏确切检验。科-斯二氏检验(Kolmogorov-Smirnov test)用于检验正态(normality)。接收器工作特性(ROC)曲线分析用于确定 VERIFYNOW™ P2Y12 测定对 PCI 后发生出院后事件的患者和 PCI 后不发生出院后事件的患者进行区分的能力。通过确定治疗后的 PRU 来计算最佳截止点(optimal cut-off point),其提供了灵敏度和特异性的最大总和。使用 R 软件进行自展确认(bootstrap validation)。使用卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)方法生成存活曲线,并且曲线之间的差异通过对数秩检验(log-rank test)来评估。认为 P 值<0.05 是具有显著性的。

这项研究总共征集了 380 名患者(参见图 2)。基线临床特征、损伤特征和操作特征显示在表 6 和 7 中。总的来说,平均年龄为 68±11 岁,76.8%为男性,14.2%患有肾功能不全,28.9%为糖尿病,以及 44.5%在 PCI 时正在接受氯吡格雷治疗。在大多数患者(93.9%)中操作适应症为稳定型心绞痛(stable angina)或缺血。治疗了平均 1.7±0.8 处损伤/患者。平均损伤长度为 20.0±13.1mm,并且植入了平均 1.4±0.7 个 SES/损伤。在所有患者中都实现了技术成功。

特征	全部组 (n=380)	较低反应性* (n=258)	高反应性* (n=122)	P 值
年龄(岁)	68±11	67±11	70±10	0.01
男性, n(%)	292(76.8)	201(77.9)	91(74.6)	0.5

糖尿病, n(%)	110(28.9)	59(22.9)	51(41.8)	0.001
先前 MI, n(%)	120(31.6)	77(29.8)	43(35.2)	0.3
高血压史, n(%)	335(88.2)	225(87.2)	110(90.2)	0.4
充血性心力衰竭史, n(%)	36(9.5)	21(8.3)	15(12.0)	0.2
LVEF<40%, n(%)	34(9.5)	22(9.2)	14(10.3)	0.7
肾功能不全(肌酸酐>1.5), n(%)	54(14.2)	31(12.0)	23(18.9)	0.08
目前吸烟者, n(%)	34(8.9)	25(9.7)	9(7.4)	0.5
体重指数, kg/m ²	29.6±6.9	29.3±6.6	30.2±7.6	0.2
伴随药物, n(%)				
ACE 抑制剂	140(36.8)	91(35.3)	49(40.2)	0.4
β 阻断剂	241(63.4)	151(58.5)	90(73.8)	0.004
阿托伐他汀	135(35.5)	95(36.8)	40(32.8)	0.4
阿司匹林	328(86.3)	223(86.4)	105(86.1)	1.0
稳定型心绞痛/缺血	356(93.7)	242(93.8)	114(93.4)	1.0

*将高反应性定义为高于 ROC 曲线分析的最佳截止点的治疗后反应性(PRU≥235), 以及将较低反应性定义为低于该阈值。

特征	全部组 (n=380)	较低反应性* (n=258)	高反应性* (n=122)	P 值
每名患者的损伤数目	1.7±0.8	1.7±0.8	1.5±0.7	0.01
每名患者的血管数目	1.4±0.5	1.4±0.6	1.3±0.5	0.1
损伤类型, n(%)				
AHA/ACC 类型 B2/C	299(78.7)	205(79.2)	94(77.7)	0.7
分叉	92(24.2)	62(24.0)	30(24.8)	0.9
隐静脉移入物	31(8.2)	18(7.0)	13(10.7)	0.2
慢性完全阻塞	26(6.8)	16(6.2)	10(8.2)	0.5
含血栓的损伤	4(1.1)	3(1.2)	1(0.8)	1.0
每处损伤的支架数目	1.4±0.7	1.4±0.8	1.4±0.7	0.3
支架直径, mm	2.86±0.36	2.84±0.35	2.91±0.38	0.004
每处损伤的支架长度, mm	30.3±20.2	30.6±20.9	29.6±18.5	0.5
最大气囊膨胀 (maximum balloon inflation), atm	16.6±2.2	16.5±2.3	16.7±2.0	0.3
进行 IVUS, n(%)	150(39.5)	105(40.5)	45(37.2)	0.5
使用比伐卢定, n(%)	152(40.0)	108(41.9)	44(36.1)	0.3

治疗后的 PRU 是正态分布的(单样本科-斯二氏检验, P=0.2)。治疗后的平均反应性为 184±85 PRU。治疗后的反应性在接受先前氯吡格雷治疗的患者和没有服用过氯吡格雷的接受负荷剂量的患者之间没有差异(186±73 PRU 对 183±94 PRU, P=0.7), 并且反应性在接受操作中的肝素或比伐卢定的患者之间也没有差异(184±86 PRU 对 184±84 PRU, P=1.0)。

98.9%的患者完成了 6 个月的临床随访。出院后, 有三例 CV 死亡(0.8%), 其中两例为猝死(在操作后的 84 天和 186 天)。在操作后的 32 天有一例非 CV 死亡(由于败血症)。在五名患者(1.3%)中发生非致死性 MI。有六例支架血栓形成发作(1.6%): 三例为确定的亚急性支架血栓形成, 一例为确定的迟

发性支架血栓形成，并且两例为可能的迟发性支架血栓形成。在 10 名患者 (2.6%) 中发生 CV 死亡、非致死性 MI 或支架血栓形成的合并终点 (combined endpoint of CV death, non-fatal MI, or stent thrombosis)。这些患者中没有一名具有欠佳的血管造影结果或有关在注册操作 (index procedure) 中的后遗症解剖结构 (residual dissection) 的血管造影证据。在 PCI 后的 8 天患上亚急性支架血栓形成的一名患者在出院后没有服用氯吡格雷 (即在所述操作后的 24 小时以后没有服用氯吡格雷)。当患者正在接受双重抗血小板治疗时发生所有其它事件。具有支架血栓形成的患者当接受抗血小板治疗时的治疗后反应性为 283 PRU、292 PRU、236 PRU、244 PRU 和 271 PRU。总共 373 名患者 (98.2%) 在操作后的 3 个月保持氯吡格雷治疗，以及 317 名患者 (83.4%) 在 6 个月的随访中保持治疗。表 8 说明了在整个 6 个月的随访中在接受氯吡格雷治疗的患者中的事件率，以及表 9 说明了在完成最少 3 个月氯吡格雷疗程的患者中的 6 个月事件率。发生有害事件的患者与没有发生有害事件的患者相比具有显著较高的血小板反应性 (242 PRU 对 186 PRU, 单尾 t-检验, $P=0.03$)。

表 8
在整个 6 个月的随访中在接受氯吡格雷治疗的患者中的六个月医院外结果

	全部组 (n=317)	较低反应性 (n=258)	高反应性 (n=108)	P 值*
CV 死亡, n(%)	3(0.9)	0	3(2.8)	0.04
非致死性 MI, n(%)	4(1.3)	2(1.0)	2(1.9)	0.6
支架血栓形成, n(%)	5(1.6)	0	5(4.6)	0.004
CV 死亡, 非致死性 MI, 支架血栓形成, n(%)	9(2.8)	2(1.0)	7(6.5)	0.008

*在具有高反应性的组和具有较低反应性的组之间的比较(表 6)。

表 9
在历时操作后的最少 3 个月接受氯吡格雷治疗的患者中的六个月医院外结果

	全部组 (n=373)	较低反应性 (n=252)	高反应性 (n=121)	P 值*
CV 死亡, n(%)	3(0.8)	0	3(2.5)	0.03
非致死性 MI, n(%)	4(1.1)	2(0.8)	2(1.7)	0.6
支架血栓形成, n(%)	5(1.3)	0	5(4.1)	0.003
CV 死亡, 非致死性 MI, 支架血栓形成, n(%)	9(2.4)	2(0.8)	7(5.8)	0.006

*在具有高反应性的组和具有较低反应性的组之间的比较(表 6)。

对在整个 6 个月的随访中在保持氯吡格雷治疗的患者中的治疗后血小板反应性进行的 ROC 曲线分析表明，治疗后的 PRU 能够区分具有随后事

件的患者和不具有随后事件的患者[曲线下面积 0.711[95%置信区间 0.529 至 0.893], $P=0.03$](图 3)。PRU ≥ 235 被认为是预测出院后 6 个月结果的最佳截止值, 其提供了 78%(95%CI(置信区间)46-94)的敏感度, 68%的特异性(95%CI 67-69)和 99%(95%CI 98-100)的负预测值。通过使用 10000 份复制品(replicate)进行的自展分析, 最佳截止的 95%置信区间的范围为 179 PRU 至 291 PRU。在完成至少 3 个月氯吡格雷治疗的患者群中, 最佳截止为 235 PRU(95%CI(其通过自展来确定)174 PRU 至 291 PRU)[曲线下面积 0.720(95%置信区间 0.540 至 0.900)($P=0.02$); 灵敏度 78%(95%CI 46 至 94); 特异性 70%(95%CI 69 至 70)]。该截止与治疗反应性的上三分位(upper tertile)的界限(>231 PRU)相似。治疗后反应性高于最佳截止值的患者被认为具有“高”治疗后反应性。与具有较低治疗后反应性的患者相比, 具有高治疗后反应性的患者是显著较老的, 较有可能是糖尿病患者, 倾向于患有肾功能不全, 以及较有可能正在服用 β 阻断剂(表 6)。具有高治疗后反应性的患者也具有较少的损伤/患者, 并且具有平均较大的植入支架直径(表 7)。

具有高治疗后反应性的患者具有显著较大的 CV 死亡率(2.8%对 0%, $P=0.04$)、显著较大的任意支架血栓形成(4.6%对 0%, $P=0.004$)、显著较大的确定或可能的支架血栓形成(2.8%对 0%, $P=0.04$)和显著较大的 CV 死亡、非致死性 MI 或支架血栓形成的合并终点(6.5%对 1.0%, $P=0.008$)(表 8 和 9)。当考虑所有原因的死亡、非致死性 MI 或支架血栓形成时, 结果之间的差异仍然是显著的(6.5%对 1.4%, $P=0.035$)。无事件存活率曲线(event-free survival curve)显示在图 4 中。无 CV 死亡、非致死性 MI 或支架血栓形成的合并终点的存活率在具有高治疗后反应性的患者中为 91.4%, 以及在不具有高治疗后反应性的患者中为 99.0%($P=0.004$)。

在这个实施例中, 对经历 PCI 的具有 DES 的患者群进行 ROC 分析, 从而(i)确定 VERIFYNOW™ P2Y12 护理时测定(Accumetrics, Inc.)对具有随后出院后事件的患者和不具有随后出院后事件的患者进行区分的能力, 以及(ii)识别以下基于临床的阈值, 所述阈值用于确定在具有高反应性的患者和具有较低反应性的患者之间的事件相对率。

在在注册住院(index hospitalization)期间用上述护理时测定所测量的在氯吡格雷治疗时的血小板反应性被发现就 DES 植入后的医院外结果

(out-of-hospital outcome)(包括支架血栓形成)而言是具有预测性的。

用于识别高风险患者的最佳截止为 $PRU \geq 235$ ；所有 CV 死亡和支架血栓形成都发生在反应性高于此阈值的患者中。此截止点与所研究的群中的 PRU 的上三分位的界限相似，这与氯吡格雷后的高反应性与随后的 CV 事件相关这一先前观察结果一致。关于最佳截止的 95% 置信区间的自展评价是相当宽的，这可能是由于在此项研究中发生的事件的数目是低的。值得注意的是，95% 置信区间的低范围(low range)仍然高于所述群中的平均 PRU，这与剩余的血小板反应性高于在 PCI 前后的中值的患者处于随后事件的较高风险中这一先前发现结果一致。

这个实施例说明了在支架血栓形成和血栓形成事件前存在氯吡格雷后的高血小板反应性之间的显著关系。所述研究中的亚急性支架血栓形成(0.8%)和迟发性支架血栓形成(0.8%)的总发生率与先前报道的一致。由于在血栓形成事件前进行了血小板功能评估，所以上述数据支持以下假设：氯吡格雷后的高反应性在支架血栓形成中是病理性因素。

这个实施例表明，处于医院外缺血事件风险中的患者，特别是处于医院外支架血栓形成风险中的患者，可使用在在注册住院期间进行的护理时血小板功能评估来分级。增加的氯吡格雷的维持给药方案可在未经选择的患者中和在处于受损应答高风险中的糖尿病患者中改善对血小板的抑制作用。第三代噻吩并吡啶即普拉雷格和其它新颖的 P2Y₁₂ 抑制剂也可用于提供更强效和更均一的对 P2Y₁₂ 的抑制作用。

尽管出于清楚理解的目的已经通过说明和实施例而在某些细节方面对上述发明进行了描述，但对于本领域技术人员来说显而易见的是，根据本发明的教导，可对本发明进行一些变化和修改而不背离所附权利要求书的主旨和范围。

将在本说明书中引用的所有出版物和专利申请并入本文作为参考，就如同具体和单独地指明各篇出版物或专利申请被引入作为参考。

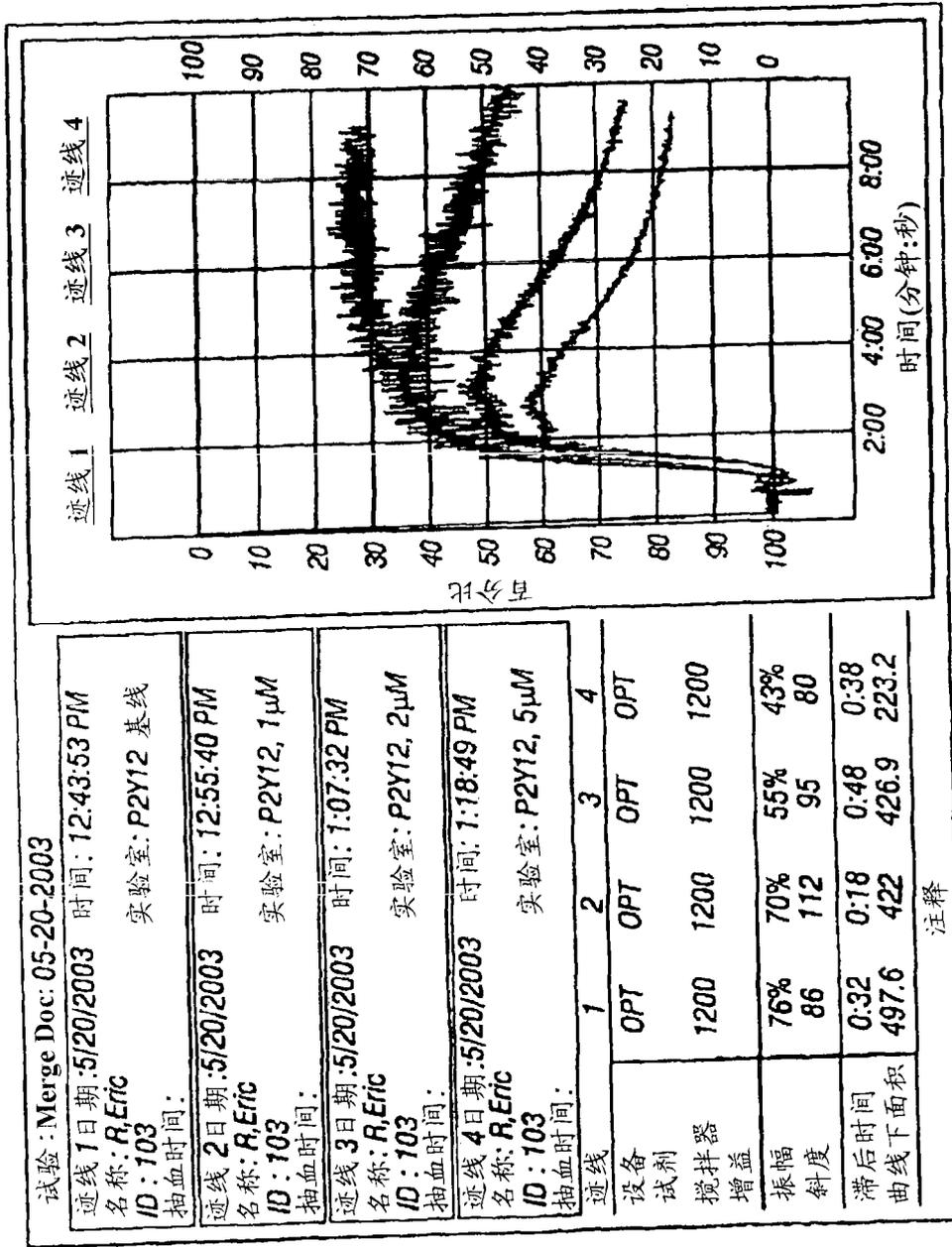


图 1

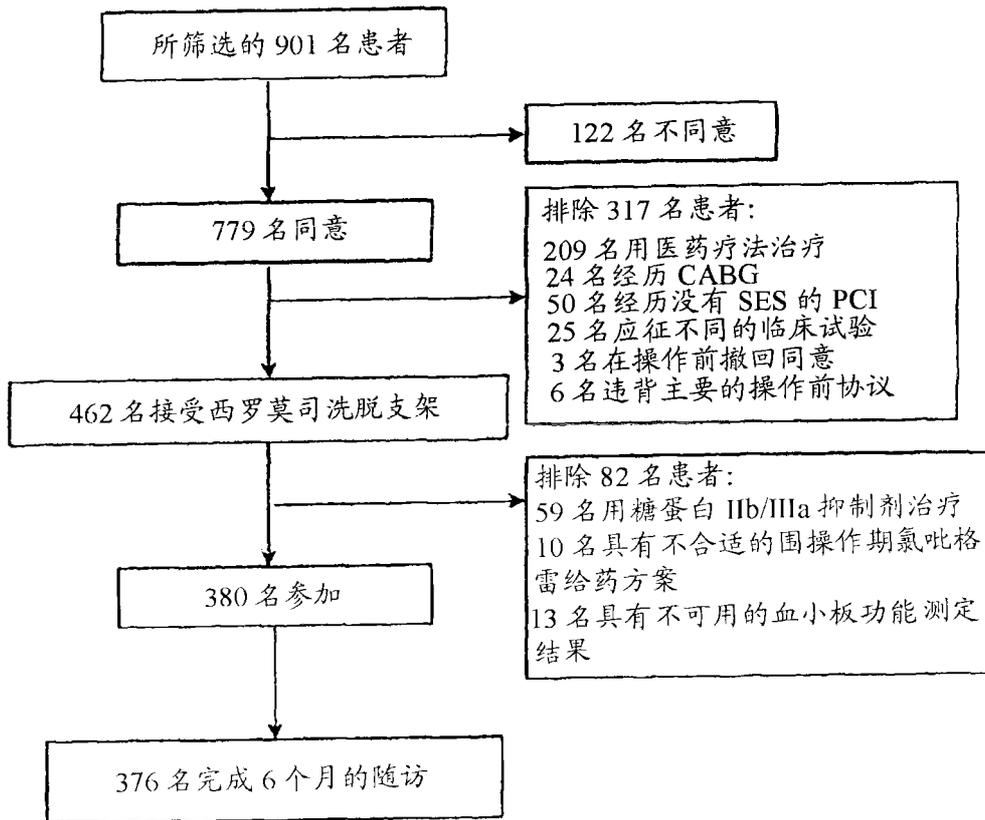


图 2

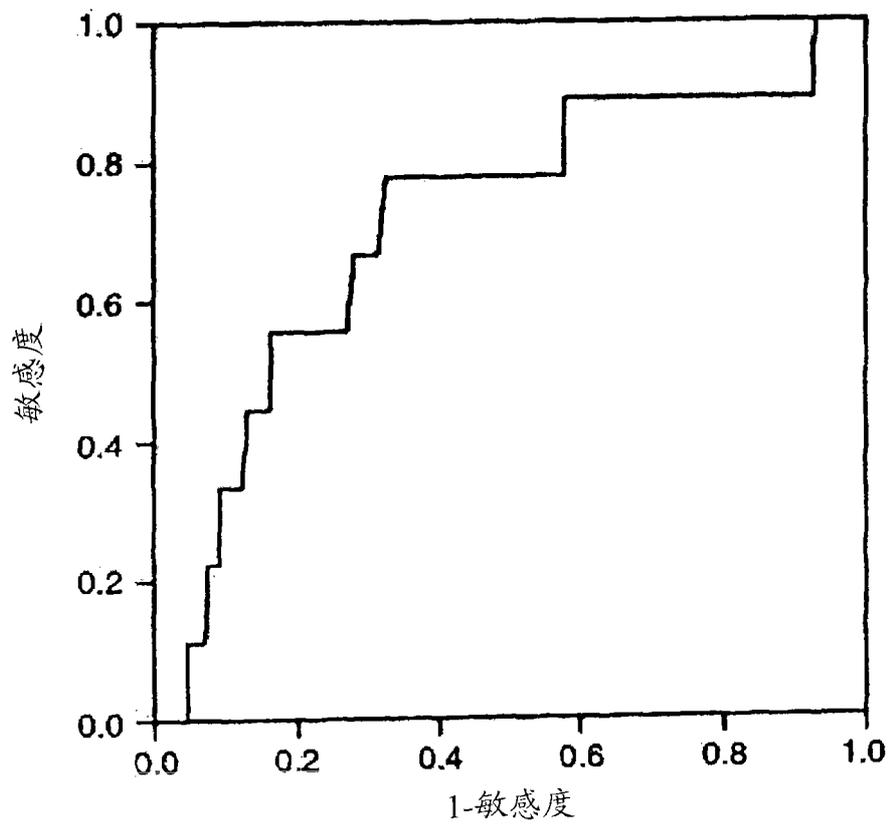


图 3

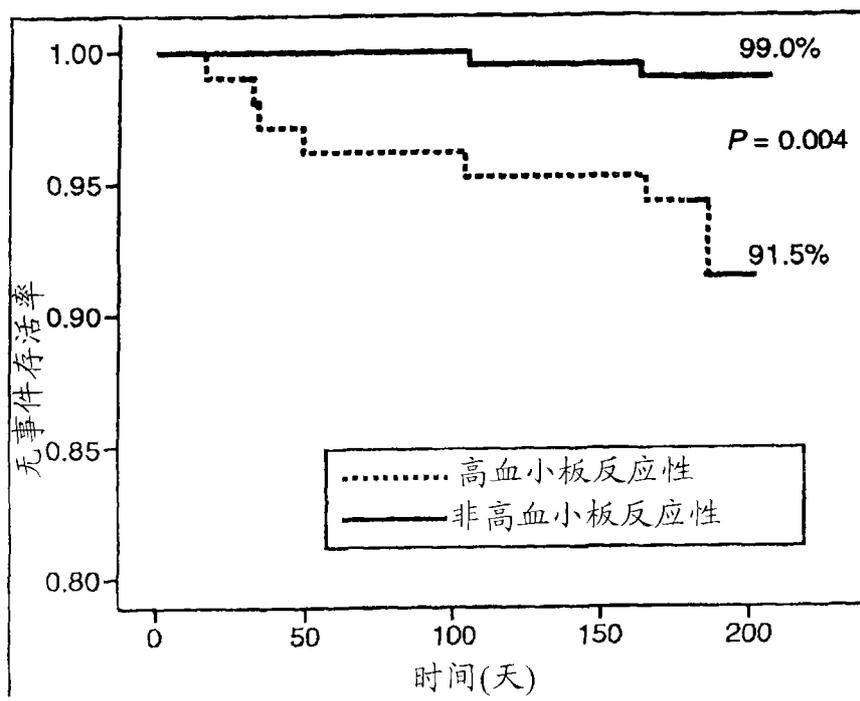


图 4