[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 39/395
A61P 7/02

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194772.6

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1140295C

[22] 申请日 1994.11.7 [21] 申请号 94194772.6
[30] 优先权
[32] 1993.11.5 [33] US [31] 08/147,928
[86] 国际申请 PCT/US94/12779 1994.11.7
[87] 国际公布 WO95/12412 英 1995.5.11
[85] 进入国家阶段日期 1996.7.4
[71] 专利权人 森特克公司
地址 美国宾夕法尼亚州
共同专利权人 纽约州立大学研究基金会
[72] 发明人 巴瑞·S·科勒 大卫·M·奈特
审查员 魏春宝

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书 4 页 说明书 87 页 附图 14 页

[54] 发明名称 血小板特异性的嵌合性免疫球蛋白及其使用方法

[57] 摘要

本发明描述了对血小板为特异性的嵌合免疫球蛋白及其片段。这种嵌合分子包括非人体来源的抗原结合区和人体来源的恒定区。优选的免疫球蛋白是对糖蛋白 IIb/IIIa 受体复合形式为特异性的；它们封闭配体与受体的结合从而防止血小板凝聚。这种免疫球蛋白可以用于降低或防止闭塞、复发性闭塞(例如急性堵塞)、狭窄和/或复发性狭窄。此外，将这种球蛋白单独或与溶血制剂同时使用时，可以用在抗血栓治疗及血栓造影中。

ISSN1008-4274

1. 与糖蛋白 IIb/IIIa 选择性结合的化合物在制备抑制狭窄和/或复发性狭窄的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其中化合物抑制血小板凝聚。

3. 根据权利要求 1 所述的应用，其中的化合物是对糖蛋白 IIb/IIIa 为特异性的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段。

4. 根据权利要求 3 所述的应用，其中的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段是包括来自于非人体抗原结合区以及来自于人体的恒定区的一部分嵌合免疫球蛋白或免疫球蛋白片段。

5. 根据权利要求 4 所述的应用，其中所述的对糖蛋白 IIb/IIIa 为特异性的嵌合免疫球蛋白片段能够封闭配体与该糖蛋白 IIb/IIIa 的结合。

6. 根据权利要求 4 所述的应用，其中所述的对糖蛋白 IIb/IIIa 为特异性的嵌合免疫蛋白片段抑制血小板凝聚。

7. 根据权利要求 4 所述的应用，其中所述的抗原结合区是从对糖蛋白 IIb/IIIa 为特异性的抗体中衍化出来的。

8. 根据权利要求 7 所述的应用，其中所述的对糖蛋白 IIb/IIIa 为特异性的抗体是 7E3 单克隆抗体。

9. 根据权利要求 8 所述的应用，其中所述的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段是从下列组中选取的免疫球蛋白片段，包括：Fab 片段,Fab'片段，和 $F(ab')_2$ 片段。

10. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述的化合物是与糖蛋白 IIb/IIIa 和玻连蛋白受体选择性结合的化合物。

11. 根据权利要求 10 所述的应用，其中所述的化合物是对糖蛋白 IIb/IIIa 和玻连蛋白受体有特异性的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段。

12. 根据权利要求 11 所述的应用，其中的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段是包括来自于非人体抗原结合区以及来自于人体的恒定区的一部分的嵌合免疫球蛋白或免疫球蛋白片段。

13. 根据权利要求 12 所述的应用，其中所述的抗原结合区是从对糖蛋白 IIb/IIIa 和玻连蛋白受体有特异性的抗体衍生出来的。

14. 根据权利要求 13 所述的应用，其中所述的对糖蛋白 IIb/IIIa 和玻连蛋白受体有特异性的抗体是 7E3 单克隆抗体。

15. 根据权利要求 14 所述的应用，其中的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段是从下列组中选取的免疫球蛋白片段，包括 Fab 片段,Fab'片段或 $F(ab')_2$ 片段。

16. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述的狭窄和/或复发性狭窄是在人体进行了冠状动脉治疗后发生的狭窄和/或复发性狭窄。

17. 根据权利要求 16 所述的应用，其中所述的治疗包括血管成形术。

18. 根据权利要求 17 所述的应用，其中所述的血管成形术是经皮经腔冠状动脉血管成形术。

19. 根据权利要求 16 所述的应用，其中所述的治疗包括癍块切除。

20. 根据权利要求 16 所述的应用，其中所述的治疗包括放置斯坦特。

21. 根据权利要求 1 所述的应用，其中狭窄和/或复发性狭窄是血管成形术后的狭窄和/或复发性狭窄。

22. 根据任何一个前面的权利要求中所述的应用，其中用来服用的药物结合下列组中的试剂一起服用，包括溶解血栓试剂和抗凝结试剂。

23. 根据权利要求 22 所述的应用，其中试剂是抗凝结试剂，抗凝结试剂是肝素。

24. 根据权利要求 23 所述的应用，其中肝素是以人体重来调节的量服用。

25. 根据任何一个前面的权利要求中所述的应用，其中用来服用的药物结合抗血小板试剂一起服用。

26. 对包括来自于非人体抗原结合区以及来自于人体的恒定区的一部分的糖蛋白 IIb/IIIa 有特异性的嵌合免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白片段在制备抑制人体冠状动脉手术后的狭窄和/或复发性狭窄的药物中的应用。

27. 根据权利要求 26 所述的应用，其中手术包括血管成形术。

28. 根据权利要求 27 所述的应用，其中血管成形术是经皮经腔冠状动脉血管成形术。

29. 根据权利要求 26 所述的应用，其中所述的治疗包括癍块切除。

30. 根据权利要求 26 所述的应用，其中所述的治疗包括放置斯坦特。

31. 根据权利要求 26 所述的应用，其中嵌合免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白片段一直血小板凝聚。

32. 根据权利要求 26 所述的应用，其中抗原-结合区是从对糖蛋白 IIb/IIIa 为特异性的抗体中衍化出来的。

33. 根据权利要求 32 所述的应用，其中嵌合免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白片段能够封闭配体与该糖蛋白 IIb/IIIa 的结合。

34. 根据权利要求 32 所述的应用，其中所述的对糖蛋白 IIb/IIIa 和玻连蛋白受体有特异性的抗体是 7E3 单克隆抗体。

35. 包括从 7E3 单克隆抗体衍化来的抗原结合区的嵌合免疫球蛋白 Fab 片段在制备抑制人体血管成形术后的狭窄和/或复发性狭窄的药物中的应用。

36. 根据权利要求 26-35 中任何一个所述的应用，其中用来服用的药物结合下列组中的试剂一起服用，包括溶解血栓试剂和抗凝结试剂。

37. 根据权利要求 36 所述的应用，其中试剂是抗凝结试剂，抗凝结试剂是肝素。

38. 根据权利要求 37 所述的应用，其中肝素是以人体重来调节的量服用。

39. 根据权利要求 26-35 中一个权利要求中所述的应用，其中用来服用的药物结合抗血小板试剂一起服用。

血小板特异性的嵌合性免疫球蛋白及其使用方法

本发明所属技术领域

在凝血块的形成过程中，血小板的凝聚起着主导作用，在正常的情况下，凝血块是为了防止血细胞从血管中漏出。但是，在某些病状下，凝血块会限制或者完全地阻止血液的流通，导致细胞坏死。

例如，在动脉粥样化的位点发生的血小板凝聚及其随后形成的血栓是形成众多疾病，例如，心胶痛、急性心肌梗塞以及在成功地进行了凝血溶解和血管成形后的再次阻塞的重要原因。急性心脏病患者一般都接受溶血制剂，例如组织血纤维蛋白溶酶原激活因子和链激酶的治疗，这些制剂将溶解凝血中的血纤维蛋白。与血纤维蛋白作用相伴随的主要的并发症是血小板凝聚所引发的再次闭塞，它还能够造成心脏的进一步受损。由于糖蛋白(GP)IIb/IIIa 受体是已知的引起血小板凝聚的主要因素，那么，封闭这些受体的制剂就被认为是能够减少甚至完全防止在凝血溶解治疗后的再次闭塞并从而提高溶血的速率。这些制剂还被认为是可以用在其它的血管闭塞性和血栓栓塞的疾病中。

封闭血小板凝聚的一种方法是使用对 GPIIb/IIIa 受体为特异性的单克隆抗体。在欧洲专利申请第 205,207 和 206,532 号中，揭示了鼠单克隆抗体，命名为 7E3 ，该抗体抑制血小板的凝聚并表现为可用于治疗人的血栓疾病。已知的是鼠单克隆抗体具有的某些特性能够严重地限制它们在人体治疗中的应用。作为外源性蛋白，鼠抗体能够刺激那些降低或者损害其治疗效率和/或在患者身上引起变应性和过敏性反应的免疫反应。在血栓栓塞疾病中，需要重复使用这些治疗制剂，因而就会提高这类免疫反应的发生率。

包括非人体来源的结合区与人体来源的恒定区的嵌合性抗体已被提出并被认为是消除鼠抗体的这些免疫反应的一种措施，见 Proc. Natl. Acad. Sci.USA, (81)：6851(1984)和 PCT 申请 NO.PCT/GB85 00392 。由于恒定区主要负责抗体分子的免疫反应性，那么带有人体来源的恒定区的嵌合性抗体引起人体的抗鼠反应的可能性就比较小。然而，无法预测的是把人体来源的恒定区与具有所需要的特异性的鼠结合区相结合是否一定能够使所得到的嵌合性抗体的免疫反应被降低和/或改善其结合能力。

与本发明相关的背景技术

本发明涉及包括有非人体来源可变区或抗原结合区与人体来源恒定区的血小板特异性嵌合免疫球蛋白。这种嵌合免疫球蛋白可以是对 GPIIb/IIIa 受体或其它血小板成分为特异性的。这些抗体可与血小板结合并且防止血小板凝聚，从而用作抗血栓剂使用在防止或降低在各种临床情况下（例如，溶解血栓治疗之后以及伴随着血管成形术）发生的血管闭塞及复发性闭塞和在防止血管狭窄及重复性狭窄之中。本发明的抗血小板抗体还可以用于造影。

附图的简要说明

图 1 是使用克隆化的可变区作为探针对 7E3 单克隆抗体的 mRNAs 的重链和轻链的 Northern 分析。

图 2A 和 2B 是质粒 p7E3V_KhC_K(图 2A)和 p7E3V_HhC_{G4}(图 2B)，它们各自带有对嵌合性 7E3 免疫球蛋白的轻链和重链进行编码的嵌合性基因结构。

图 3 是由载体 p7E3V_KhC_K和 p7E3V_HhC_{G4}编码的嵌合性 7E3 免疫球蛋白与血小板的结合。

图 4 是嵌合性 7E3 （ c7E3 ）免疫球蛋白对血小板凝聚的抑制。

图 5 是说明血浆抗体浓度(ng/mL)对时间（天数）的点阵图解，表明在三位长期冠心病患者接受 5 分钟静脉渗透 0.20-mg/kg 剂量的 c7E3 Fab 后,c7E3 Fab（γ_1,κ)的迅速从血浆中消失的速度。

图 6（A-C）是在使用了抗体（γ_1,κ)两小时后一次施给嵌合性 7E3 Fab(0.15mg/kg,0.20mg/kg 及 0.25mg/kg)浓缩药丸对血小板活性的效果的总结。当对受体封闭(图 6A,上)，血小板凝聚(图 6B,中)，和失血时间(图 6C,下)进行分析后，这些剂量对血小板活性的作用得到证实，其中的线条是平均值。

图 7(A-C)表明在进行血管成形术之前以 0.25mg/kg 浓缩药丸剂量给药 c7E3 Fab（γ_1,κ)的抗血小板效果的作用时间。其中的线条表明的是在基线上时间为 0 至第 24 小时的受体封闭(图 7A,上)，血小板凝聚(图 7B,中)，和失血时间(图 7C,下)的平均值。

图 8(A-C)总结的是在 11 位患者中按 0.25mg/kg 浓缩药丸剂量给药，然后再进行 12 小时 c7E3 Fab（γ_1,κ)的连续渗透(10 μg/分)的抗血小板活性。其中的线条表明的是受体封闭百分度(图 8A,上)，给药前的血小板凝聚百分度(基线上的零点)(图 8B,中)，和失血时间(图 8C,下)的平均值。

图 9 是在实施例 4 中对 47 位患者进行渗透后的从基点到 24 小时的血细胞比容的绝对变化值。

图 10 是表明对三组接受治疗的人员进行随机处理后，不需要进行紧急重复经皮血管治疗的概率的 Kaplan-Meier 点阵图。

图 11 是对接受治疗的人员中的关键组(图中右侧)的优势比例和 95%的置信区间的图示。其中的数据表示主要效率终点 [死亡,非致命性梗塞,紧急血管成形或手术,对不应性局部缺血放置冠状动脉内斯坦特(stent)或主动脉内的气囊泵]。此外，对每一亚组的主要终点的绝对事件比率在左侧例表给出 [事件比率(%)]。

图 12 给出的是所有患者中在 6 个月追踪期不发生事件的分数。

图 13 表示的是在那些接受了成功的治疗之后 30 天没有发生事件的患者之中的在随后 6 个月追踪期内不发生事件的患者的分数。

图 14 表示的是在接受了成功的初期治疗后 48 小时没有发生事件的患者在随后 6 个月追踪期内不发生事件的患者的分数。

图 15 表明的是在所有的患者中在随后 6 个月追踪期内不需对与治疗有关的动脉(PRA,治疗有关的动脉)进行血管再造的患者的分数。

本发明的技术方案

本发明的嵌合免疫球蛋白包括单个的免疫球蛋白嵌合重链和嵌合轻链。嵌合重链包括从非人体来源的对血小板（例如，对 GPIIb/IIIa 受体）为特异性的重链维生素的抗原结合区与人体来源的重链恒定区结合在一起。嵌合性轻链包括从非人体来源的抗体的轻链衍生的抗原结合区与人体来源的轻链恒定区结合在一起。

本发明的免疫球蛋白可以是单价的，双价的或多价的。单价的免疫球蛋白是二聚体（ HL ），由嵌合重链通过二硫键与嵌合轻链相结合在一起而形成的。二价的免疫球蛋白是四聚体（ H_2L_2 ），由两个二聚体通过至少一个二硫键结合在一起而形成。多价的免疫球蛋白也可以被制造出来，例如，使用可聚合的重链恒定区（例如，μ 重链恒定区）。嵌合免疫球蛋白片段，例如 Fab, Fab'和 $F(ab')_2$ 也可被制造出来。

嵌合免疫球蛋白的非人体来源的抗原结合区是从对血小板为特异性的免疫球蛋白中产生。优选的免疫球蛋白是对血小板 GPIIb/IIIa 受体为特异性，并且能够阻止配体结合到糖蛋白的 IIb/IIIa 受体的复合体上。

当血小板粘结在血管壁受到损伤的位置时就开始产生血栓。血小板的粘结是受血小板表面受体调控的，这些受体与暴露出来的内皮下组织的细胞外的基质蛋白相结合，例如 von Willebrand 因子，胶原，纤维连结素，玻连蛋白和昆布胺酸。血小板的粘结导致单层的血小板排列。随后血小板的激活是在对激活剂，例如肾上腺素， ADP ，胶

原或凝血酶等发生反应时产生。激活导致血小板表面的糖蛋白 IIb/IIIa 受体(GPIIb/IIIa)被暴露出来。在被激活的血小板上的 GPIIb/IIIa 就可与纤维蛋白原相结合，并且调控血小板的凝聚。 GPIIb/IIIa 与其它粘结性蛋白的结合，例如 von Willebrand 因子的结合还可以导致血小板的交联和凝聚。因此，粘结性分子例如纤维蛋白原和 von Willebrand 因子与 GPIIb/IIIa 的结合就造成血小板的凝聚，并且是血栓形成中的一个共同步骤，这样就使得 GPIIb/IIIa 受体成为治疗剂的具有吸引力的靶标，这些治疗剂可以干扰 GPIIb/IIIa 与这些分子的相互作用。此外，使用抗 GPIIb/IIIa 嵌合抗体可以在不干扰血小板的初始粘接的条件下抑制被激活的血小板的凝聚。这种对血小板凝聚的选择性的抑制可能正是人们所期望的，因为在不发生凝聚的条件下血小板的粘结可以对止血有利。

适宜的对血小板为特异的抗体包括 7E3 和 10E5 。参见欧洲专利申请 205,207 号和 206,532 号，其中的教导通过引述在此结合于本文。最优选的是的 7E3 抗体（或者是与相同的或功能上等同的对象产生反应的抗体），因为它是对复合形式的 GPIIb/IIIa 受体为特异性的。其它的对 GPIIb/IIIa 受体（被 7E3 识别的抗原）为特异的抗体，例如那些对 IIb/IIIa 成分为特异性的抗体也可被使用。还可以使用对其它血小板抗原为特异性的抗体。例如与血小板 α 粒膜蛋白 GMP-140 起反应的抗体，例如 S12 抗体(J. Biol. Chem.,259:9799-9804(1984);美国专利 No.4,783,330)也可被使用。

嵌合抗体的抗原结合区可以从非人体来源的免疫球蛋白中衍生。优选的抗原结合区来源于鼠，因为鼠抗血小板，特别是 GPIIb/IIIa 受体的抗体可以从鼠中产生并且是可获得的。其它的动物和啮齿类提供了抗原结合区的另外来源(参见 Newman et al.,Bio/technology,10:1455-1460(1992))。在一个实施方案中，嵌合免疫球蛋白的抗原结合区包括非人体来源的对血小板为特异性的免疫球蛋白的、足够对抗原结合区为特异性或选择性的至少一部分,例如从非人体来源的免疫球蛋白产生的一种或多种辅助性确认区(参见 Winter,美国专利 No.5,225,539 ，欧洲专利 No.0,239,400 ，英国专利 No.2,188,638 ； Adair et al.,WO 91/09967 ； Jolliffe et al., WO 91/09966)。在另一个实施方案中,嵌合免疫球蛋白包括至少一条由非人体来源的免疫球蛋白的重链的可变区与人体来源的重链的恒定区的至少一部分相连接的嵌合重链和

一条从非人体免疫球蛋白的轻链产生的可变区与人体来源的轻链的恒定区的至少一部分共价连接的嵌合轻链。其它的可变区与恒定区的组合方式也是可能的(参见美国专利第5,169,939号)。

嵌合抗体的恒定区是从人免疫球蛋白中产生的。重链恒定区可以从五种同型物 $\alpha,\delta,\varepsilon,\gamma,\mu$ 中选择。进而言之，不同亚组的重链(例如IgG亚组重链)对不同的功能因子负责，因此，选择所需的重链恒定区就可以产生具有所需功能因子的嵌合抗体。优选的恒定区是$\gamma1$(IgG1)，$\gamma3$(IgG3)和$\gamma4$(IgG4)。轻链恒定区可以是κ和λ型。

总而言之，在制备嵌合抗体时对嵌合免疫球蛋白的每一轻链和重链成分都制造一个融合基因，该基因包括对非人体来源的血小板特异性可变区的功能部分的至少一部分(例如将可变区与相邻段进行功能性重新安排)进行编码的第一 DNA 片段与对人体来源的恒定区的至少一部分进行编码的第二 DNA 片段连接。每一个融合基因都是在表达载体中组建或插入到其中，产生含有处于可表达形式的融合基因的表达载体。在一个实施方案中，含有抗原结合区的 DNA 是通过间隔序列与恒定区共价结合在一起。在另一实施方案中，可以制造出缺少一个或多个间隔序列的结构。能够表达这些基因产物的受体细胞就被用这些基因进行转染。被转染的受体细胞在允许对所插入的基因进行表达的条件下进行培养，然后回收表达出来的免疫球蛋白和免疫球蛋白链。

对 Ig 轻链和重链的可变区进行编码的基因可以从产生血小板特异性抗体的淋巴细胞中获取。例如，那些产生抗 GPIIb/IIIa 抗体的杂交瘤细胞系是本发明嵌合抗体的免疫球蛋白可变区的一种来源。其它的啮齿类细胞系也是可选用的。用人血小板或包含 GPIIb/IIIa 受体成分或血小板片段对啮齿类进行攻击，在产生抗体的细胞和骨髓瘤细胞系之间形成融合杂交细胞，将所得杂交细胞克隆化，选择那些产生抗血小板或 GPIIb/IIIa 受体的抗体的克隆，从而产生所需的细胞系。

用常规的克隆技术可以从人的产生抗体的细胞中得到恒定区。另外，由于代表两类轻链和五类重链的基因已经被克隆化了，所以人体来源的恒定区可以从这些克隆中得到。嵌合抗体结合片段例如 $F(ab')_2$和 Fab 片段可以通过将嵌合重链基因制成被剪切的

形式而制取。例如，对 $F(ab')_2$ 重链部分进行编码的嵌合基因包括对重链的关节区和 CH_1 部分进行编码的 DNA 序列。另外，这些片段可以通过对嵌合免疫球蛋白进行酶切来得到。例如，使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶的酶切可以分别得到 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。

优选地，对嵌合轻链和重链（或它们的一部分）进行编码的融合基因可以装配于两种不同的并可对受体细胞进行共转染的表达载体之中。每一个载体都包含两个可选择的基因，一个基因用于在细菌系统中进行选择，另一个用于在真核细胞体系中进行选择，每一个载体含有不同的一对基因。这些载体可以使融合基因在细菌系统中生产和放大，然后在真核细胞中进行共转染并选择被共转染的细胞。用于细菌体系的可选择的基因包括例如那些具有氨苄青霉素抗性的和那些具氯霉素抗性的基因。在对真核转染物进行选择的两种选择性基因优选：(i)黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(gpt)，和(ii)从 Tn5 来的磷酸转移酶(定名为 neo)。选择 gpt 依据的是这个基因所编码的酶将黄嘌呤作为底物合成出嘌呤核苷酸的能力；其它的内生性酶的类似物是无法完成这一任务的。在含有黄嘌呤霉酚酸的培养基中，因为该培养基可以阻止次黄苷单磷酸盐转变成黄嘌呤单磷酸盐，所以，只有表达 gpt 的基因可以在其中存活下来。 neo 基因的产物封闭由抗生素 G418 和其同类的抗生素所造成的对在真核细胞中的蛋白合成的抑制。这两种选择程序可以同时使用或者顺序使用，以对插入到真核细胞中的两个不同的 DNA 载体上的免疫球蛋白链基因的表达进行选择。

优选的受体细胞系是骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞可以对转染的 Ig 基因所编码的免疫球蛋白进行合成，组建和分泌。此外，它们还具有对免疫球蛋白进行糖化的机制。特别优选的受体细胞是一种不产生 Ig 的骨髓瘤细胞系，例如，Sp2/0 。这些细胞系仅仅产生由转染的免疫球蛋白基因所编码的免疫球蛋白。骨髓瘤细胞可以在培养基中或者在小鼠的腹膜中生长，并分泌免疫球蛋白，然后从腹水中获取这些免疫球蛋白。其它的淋巴细胞例如 B 淋巴细胞或杂交瘤细胞也可作为适当的受体细胞。

现在已有几种用含有免疫球蛋白编码基因的载体对淋巴细胞进行转染的方法。一种优选的将 DNA 引入到淋巴中的方法是电穿孔法(electroporation)。在这一方法中，在有要被引入的 DNA 存在的条件下对受体细胞进行电脉冲刺激。参见 Potter et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161 (1984)。另一种引入 DNA 的方法是原生质体融合。在这一方法中对含有包含嵌合 Ig 基因的重组质粒的细菌的细胞壁用溶菌酶进行处理。所得到的原生质球与骨髓瘤细胞用乙二醇进行融合。原生质融合完成后，对被转染的细胞进行选择和分离。另外的一种可以将 DNA 引入到众多细胞的方法是磷酸钙沉淀法。

嵌合免疫球蛋白基因还可以在非淋巴细胞中进行表达，例如在细菌或酵母菌中。当在细菌中进行表达时，免疫球蛋白重链和轻链就变为内含体的一部分。因此，这些链就必须被分离和提纯，然后组建到功能性免疫球蛋白分子中。其它的在大肠杆菌 E. coli 中进行表达的方法是已知的（参见 Pluckthun, A., Bio/Technology, 9:545-551(1991);Skerra, A. et al., Bio/Technology , 9:273-278(1991)），包括从 E. coli 分泌含有信号序列的融合蛋白。

血小板特异性嵌合免疫球蛋白的用途

本发明的嵌合血小板特异性抗体可用作抗血栓治疗制剂。例如,嵌合抗体(或其片段)可用于患有血栓或具有发生血栓危险的患者以抑制血小板的凝集和血栓的发生。这些抗体还可以用于抑制由血小板凝集引起的血液循环异常及其进而造成的血栓或血栓的复发情况。这些抗体可以用于防止血栓形成或复发性血栓(复发性闭塞)的各种情况。此外，这些抗体还可用于抑制狭窄或复发性狭窄（减低，延迟或预防）的各种情况。

例如，患有或可能患有冠状动脉疾病的患者可以通过使用有效剂量的本发明的嵌合抗血小板抗体片段（例如，嵌合抗 GPIIb/IIIa 抗体或优选其片段，例如，嵌合 7E3 Fab 或 $F(ab')_2$）来抑制血管的闭塞，复发性闭塞，狭窄和/或复发性狭窄。

例如，本发明的抗体可以使用于个体（例如，哺乳动物，例如人）以防止肺部血栓，瞬时性失血(TIAs),深度静脉血栓，冠状动脉分流手术，插入人造瓣膜和血管(例如,在自体性,非自体性或合成性血管植入中)。本发明的抗体还可以用于患者在进行气囊,冠状动脉瘢块切除(atherectomy),和激光血管成形术(angioplasty)及其它适当的血管成形术之前,之中或之后来防止血小板凝集或血栓。抗体可在进行血管成形术之前,

之中或之后使用。这类处理方式可以防止血栓的形成,进而降低在血管成形术之后的并发症的出现，例如,死亡,心肌梗塞,进行导致 PTCA 时的局部缺血事件或冠状动脉分流手术(急性局部缺血事件)。此外，这种治疗可以获得长期的效果，减少冠状动脉介入手术(例如,血管成形术)的局部缺血事件和并发症的发生，例如,死亡,心肌梗塞,导致进行 PTCA 时的局部缺血事件或冠状动脉分流手术(血管再造)，指示性降低，延迟或防止狭窄或复发狭窄。

例如在实施例 4 中所示，当在进行血管成形手术［经皮经腔冠状动脉血管成形术（ percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA ）］之前将嵌合抗血小板抗体（嵌合 7E3 Fab 片段）作为辅助治疗剂使用时，就可以有效地提高失血时间，并且降低拮抗剂引导的血小板凝聚，正如用体外血小板凝聚检测方法所测的结果所示。在实施例 4 和 5 中的实验的结果还表明对血小板 GPIIb/IIIa 的封闭和用 c7E3 抗体（ Fab 片段）对血小板凝聚的抑制可以在人的体内产生有效的抗血栓效果。

在实施 6 和 7 中给出的结果是使用嵌合 7E3 抗体片段的随机的双盲性对照研究结果。在实施例 6 中给出的数据揭示了对进行血管成形手术和有发生血管堵塞（复发性闭塞）高度危险的患者给以嵌合 7E3 抗体片段，可以有效地防止急性堵塞，同时降低了急性局部缺血的发生。正如在实施例 7 中进一步所表明的，对这类患者采用相同的处理可以降低、延迟和/或防止以后的复发性血管狭窄。

这种使用嵌合抗 GPIIb/IIIa 抗体片段（见实施例 7 ）所产生的对非急性局部缺血并发症的长期有利效果是没有先例的。此外，那些能够选择性地与 GPIIb/IIIa 受体相结合的化合物可以用来防止或者降低狭窄或重复性狭窄的发生，同时能够带来有效的在临床上降低非急性局部缺血并发症的发生率。当使用这些化合物时，还可以另外地防止闭塞或者重复性闭塞。这些化合物包括，例如 GPIIb/IIIa 拮抗药，免疫球蛋白或非免疫球蛋白的肽或蛋白质（例如合成性的或者重组的）及它们的类似物，核苷酸或核苷酸类似物。当患有或有可能患冠状动脉疾病的患者接受有效剂量的这些选择性地与 GPIIb/IIIa 受体相结合的化合物时，就可以抑制血管的闭塞，复发性闭塞，狭窄和/或复发性狭窄。

给药

血小板的凝聚诱发链锁凝固并且产生更加稳定的（血）纤维蛋白网状结构和凝血块，它们可以被血栓溶解剂来溶化掉。本发明的选择性地与 GPIIb/IIIa 受体相结合的抗体或化合物可以单独地或与血栓溶血制剂，例如，纤维蛋白溶酶原激活子（例如，组织血纤维蛋白溶酶原激活子、尿激酶、链激酶、重组的组织纤维溶酶原激活子），或抗凝固剂（例如，抗凝血酶），或抗血小板剂例如阿斯匹林、肝素、水蛭素或香豆素抗凝固剂（例如苄丙酮香豆素）等结合使用于人体(如,人)，从而防止及降低血栓溶解治疗后的复发性闭塞并加速凝血块的溶解。这些化合物、抗体或其片段可以在使用血栓溶血剂、抗溶血酶制剂、抗凝固制剂或抗血小板之前、之后或同时按有效剂量使用，从而防止那些能够导致闭塞或重复性闭塞的血小板凝集和/或延迟或防止狭窄或复发性狭窄。

有效剂量的（即足以获得所需治疗效果的剂量，例如抑制血小板凝聚并从而抑制血栓的形成或复发性血栓的剂量，能够降低或延迟或防止狭窄或重复性狭窄或局部缺血的有效剂量）化合物或抗体或抗体片段可以按肠胃外的形式，优选静脉输入的方式，在药物上可接受的载体，例如无菌生理盐水中对患者给药。还可包括缓冲剂。这些抗体的制剂还可以包括另外的添加剂，例如稳定剂（多乙氧基醚 80 ， USP/NF ）。这些抗体可以单一剂量、连续性使用或以多重渗透（例如，浓缩药团注射然后进行连续渗透）使用。此外，这些化合物和抗体还可以被可调控的释放方式［例如，用聚合物或外贴缓释装置（ patch ）］或另外的适当的方式来给药。给药的剂量将要根据不同的因素，例如临床症状，患者的体重以及是否伴有其它药物（例如，血栓溶解剂）等一起使用而决定。

在用抗血小板抗体的重复治疗中，会发生药物引起的血小板减少症，其原因可能是身体将抗体所包被的血小板认作是外来蛋白质，从而产生更多的抗体来抵抗它们，并将它们以比正常情况更快的速度通过网状内皮的系统清除出去。由于 GPIIb/IIIa 受体在血小板的表面上的浓度很高（每个血小板上有约 80,000 受体）以及在循环系统中的血小板的数量很大（约 0.25 — 0.5 × $10^6/\mu l$），因而使用抗血小板抗体的治疗的一个

显著的并发症是血小板减少症。然而，使用嵌合抗血小板（抗 GPIIb/IIIa ）抗体可以避免这种问题。本发明的嵌合抗血小板抗体可以消除（减少或防止）在使用其它抗血小板抗体时产生的血小板减少症。例如，在使用嵌合 7E3 Fab （参见实施例 6 和 7 ）时只观察到很少的血小板减少症的症状的出现。

另外，当对人给予嵌合 7E3 Fab 抗体片段时，显示出了与其来源于鼠的等同物相比为另人吃惊的低的诱发性免疫反应（参见实施例 4 和 7 ）。当与血小板结合时，抗血小板嵌合性抗体的来源于鼠的主要成分就与血小板表面相结合，例如通过 GPIIb/IIIa 受体，因此，就将使得它们无法与免疫系统相接触，并使嵌合抗体在功能上与其相对应的来源于人的抗相同表位的抗体无法区分。因此，本发明的其它嵌合抗血小板抗体尽管具有来源于鼠的抗原结合区，但是它们在非免疫性上是非常类似的。

本发明的血小板特异性嵌合免疫球蛋白还可以用于血栓造影。要达到这一目的一般优选使用抗体片段。如上所述，嵌合性重链基因可以被以剪切的形式设计出来，从而生产出嵌合性免疫球蛋白片段（例如 Fab,Fab'和 $F(ab')_2$ ）用于免疫闪烁图造影(immunoscintigraphic imaging)。这些分子可以直接用或者通过螯合剂例如 DTPA 被放射性同位素例如 ^{131}碘,^{125}碘,^{99m}锝或 ^{111}铟等标记，产生放射性免疫闪图剂。另外可以在嵌合抗体位点中设置一个放射性金属结合（螯合）区，从而对标记物提供位点。这样，嵌合免疫球蛋白可以被设计为一种具有非人体来源的血小板特异性可变区、人体来源的恒定区（优选被剪切的）、以及一个由金属结合蛋白质例如金属硫因产生的金属结合区的蛋白质。

血小板特异性嵌合免疫球蛋白或其片段可以对那些被怀疑患有血栓的病人给药。当以足够的时间允许被标记的免疫球蛋白到达血栓位点区时，则由标记产生的信号被光扫描设备例如γ 照相机检测到。然后将检测到的信号转换成血栓的图像。这种图像就可以帮助在体内确定血栓的位置并设计出适合的治疗方案。

本发明将由以下的实施例得以进一步的说明，但并不受其限制。

本发明的最佳实施例

实施例 1

嵌合血小板特异性 IgG4 的制备

A. 总体方案

由 7E3 杂交瘤对用于重链和轻链基因的可变区进行克隆化的总体方案是基于对功能性重新排列(和表达)Ig 基因的可变区和相应的结合区（ J 区）的基因组之间的连接。 J 区 DNA 探针可以用于筛选基因库以分离连接到 J 区的 DNA ，在种系表形（未被重新排列的）中的 DNA 还可以杂交到 J 探针中，但是并不连接到可变区序列上，可以通过对分离出来的克隆用限制酶分析对其进行确认。

因此，克隆化的方案是使用 J_H 和 J_K 从被重新排列的重链和轻链基因中分离出可变区。对这些克隆进行 Northern 分析(Northern analysis)以确认它们的序列是否在 7E3 杂交瘤中被表达。那些含有被表达了的序列的克隆被放置到含有人体来源的恒定区的表达载体中，并被转染到小鼠骨髓瘤细胞中以确定是否有抗体的产生。然后对从细胞中产生的抗体与 7E3 鼠抗体比较以确定其结合特异性和功能性。

有关的细胞系和鼠杂交瘤 7E3 被存放于 ATCC （ American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA ），存放日期是 1985 年 5 月 30 日，保存号是 HB8832 ，并被确认为是存活的。

B. 材料和方法

除非另有说明，本文中所给出的份数和百分数都是以重量为基准的，温度以℃度为准。

重链基因组库的构建

为了从 7E3 杂交瘤中分离出重链的可变区基因，用噬菌体λ载体 gt10 建立了依照大小选择的基因组库。使用 J_H 探针对被 EcoRI 消化的 7E3 DNA 进行了 Southern 分析(Southern analysis)，揭示了对应于被重新排列的重链的位置的一个单一的 3.5kb 带。这个片段非常可能含有 7E3 重链可变区基因。从 7E3 杂交瘤细胞中分离出来的大分子 DNA 被用限制性内切酶 EcoRI 完全消化。然后对该 DNA 在 0.7%琼脂凝胶上进行分级分离，并从凝胶中直接获取尺寸范围为 3 — 4kb 的 DNA 。在用苯酚/氯仿萃取后和交联葡聚糖 G-50 凝胶过滤后，对 3 — 4kb 的片段用 λgt10 臂(Promega Biotech, Inc.)配位，再用从 Promega Biotech 获取的 Packagene 在体外将其包装在噬菌体颗粒内。用 ^{32}磷标记的 J_H探针在浓度为大约每 150mm 培养皿中有 30,000 噬菌体的条件下对这个库进行直接筛选。在 5X SSC ，50 %甲酰胺， 2X Denhardt 试剂， 200μg/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 中以 42 ℃的温度对这些噬菌斑进行杂化 18 — 20 小时。最后,用 0.5X SSC ， 0.1% SDS 在 65 ℃进行清洗。用放射自显影照相鉴定了阳性的克隆。

轻链基因组库的构建

为了分离用于 7E3 轻链的可变区基因，在λ 载体 EMBL-3 上构建基因组库。大分子量的 DNA 用限制内切酶 Sau3A 进行部分消化，并在 10 — 40 %蔗糖浓度梯度上进行按大小尺寸的分组。具有 18 — 23kb 的 DNA 片段与 EMBL-3 臂相配位,然后再用 Packagene 将其在体外装入到噬菌体颗粒中。用 J_K探针在浓度为大约每 150mm 培养皿中有 30,000 噬菌体的条件下对这个库进行筛选。杂化和清洗的条件都与前述重链基因组库的相同。

DNA 探针

小鼠重链 J_H探针是含有 J3 和 J4 碎片的 2 kb BamHI/EcoRI 的片段。小鼠轻链 J_K 探针是含有所有 5 种 J_K 碎片的 2.7 kb HindIII 片段。 ^{32}磷标记的探针用从

Amersham, Inc.获取的制剂盒进行缺口转译来制备。用交连葡聚糖 G-50 柱进行离心把游离的核苷酸去除。该探针的特异活性大约是 10^9cpm/μg 。

Northern 分析

总量为 15μg 的细胞 RNA 用 1%琼脂/甲醛凝胶(Maniatis, et al, Molecular Cloning)进行电泳并转移到硝化纤维素上。在 5X SSC , 50 %甲酰胺, 2X Denhardt 溶液和 200μg/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 中用 42 ℃对渍点用缺口转译的 DNA 探针进行杂化。最后清洗的条件是 0.5X SSC, 0.1% SDS,65 ℃。

采用电穿孔法的 DNA 转染

被转染的质粒 DNA 被在溴化乙锭/氯化铯梯度离心至平衡两次来进行纯化。将 10 — 50μg 的质粒 DNA 加到放置在冰上的处于 PBS 中的 8 × 10^6 SP2/0 细胞中，将该混合物放在 Biorad 电穿孔设备上。进行电穿孔的电压是 200 伏特，然后将细胞放置到 96 孔微滴盘中。 48 小时后用药品进行筛选，然后经过 1 — 2 个星期将对药物有抗性的克隆鉴定出来。

抗体生产的定量化

按照颗粒浓度荧光免疫分析法(Jolley, M.E. et al., (1984) J. Immunol. Meth. 67:21)用纯化的 IgG 得出的标准曲线分析组织培养上清液中的 IgG 蛋白含量。使用山羊抗人 IgG Fc 抗体包被的聚苯乙烯珠粒和用结合有山羊抗人 IgG Fc 抗体的荧光素对带有人恒定区的嵌合 7E3 抗体的浓度进行确定。本分析用自动化的仪器(Pandex Laboratories, Inc.)完成。

血小板特异性嵌合 IgG4 抗体的纯化

用 Diaflo YM100 超滤膜(Amicon)对组织培养上清液进行浓缩，然后装载到蛋白质 A 琼脂糖柱上。用 pH6.5 — pH3.5 的柠檬酸钠的 pH 梯度将嵌合抗体从该蛋白

质 A 柱上洗脱下来。被纯化的抗体用 Diaflo YM100 超滤膜进行浓缩。抗体的浓度根据其在 280nm 的吸收来确定。

抑制结合的分析

被纯化的抗体(鼠 7E3 或嵌合 7E3)与放射性碘化的 7E3 竞争与人血小板相结合。用柠檬酸化的人全血以 1875 rpm 离心 3.5 分钟来制备富含血小板的血浆(PRP)。将 ^{125}碘标记的 7E3 抗体(150,000 cpm)加入到适当稀释浓度的纯化的受试抗体中，然后加入 150μl PRP 中来启动该反应。在室温下保育 1 — 2 小时，然后将其放入 0.4ml microfuge 管中的 30%蔗糖内以 12,000g 离心 4 分钟将结合有抗体的血小板与游离的抗体分离开来。在管的尖部的含有血小板/抗体的小丸被取出并放在γ计数器上计数。碘化的 7E3 与嵌合 7E3 之间对血小板的竞争同碘化的 7E3 与未标记的 7E3 IgG 之间的竞争进行比较。

对血小板凝聚的抑制

将纯化的 7E3 或嵌合的 7E3 抗体加入到柠檬酸化的人全血中，并在 37 ℃保育 10 分钟。血小板凝聚的速率是在用胶原或 ADP 活化后使用全血集合度计(Chronolog Corp.)测量的。

C．结果

血小板特异性可变基因区的克隆化

在用 J_H和 J_K探针分别对大约 100 万个噬菌斑进行筛选之后，从其重链和轻链基因组库中分离出来了几个阳性克隆。在进行了至少 3 次纯化之后，从每一个阳性的克隆中分离出来了细菌噬菌体 DNA，用 EcoRI(重链克隆)或 HindIII(轻链克隆)进行消化，并用 1%琼脂糖凝胶进行分组。

将该 DNA 转移到硝基纤维素上，用 J_H(重链)或 J_K[32]磷标记的 DNA 探针对渍点进行杂化。在重链中分离出两个克隆，含有与 J_H 探针杂化了的 3.5kb EcoRI DNA 片段。用 J_K 探针鉴定出了两类分别为 3.0 和 6.0kb 的 HindIII 片段。

与来自于 7E3 杂交瘤的原始重链和轻链可变区相对应的克隆化的 DNA 要与从杂交瘤中分离出来的 mRNA 杂化。在重链或轻链位置上的非功能性 DNA 重新排列将不被表达。图 1 给出的是 Northern 分析，表明的是推断的 3.5kb EcoRI 重链片段和推断的 6.0kb HindIII 轻链片段各自与来自 7E3 杂交瘤的适当大小的 mRNA 的杂化。这些亚克隆的片段被缺口转译进行 [32] 磷标记，并且被杂化到含有来自于 SP2/0(7E3 杂交瘤的融合伴侣)或来自于 7E3 的全 RNA 的 northern 渍点，如图 1 所示。 3.5kb EcoRI 重链片段与 7E3 RNA 的 2 kb mRNA 发生杂化，而不与 SP2/0 RNA 的 2kb mRNA 发生杂化。相似地， 6.0kb 轻链 HindIII 片段与 7E3 RNA 的但不与 SP2/0 RNA 的 1250 bp mRNA 相杂化，这些尺寸分别是重链和轻链 mRNAs 的正确尺寸。因为克隆化的 DNA 片段含有在 7E3 杂交瘤中表达的序列，这些数据就表明这些克隆含有来自于 7E3 杂交瘤的正确的可变区序列。然而，其功能性的最后测试是由这些序列与适当的恒定区序列结合在一起时能够指导合成具有与鼠 7E3 抗体相似的特异性和亲和性的抗体而证实。

载体和表达系统

从 7E3 杂交瘤克隆化的推断的轻链和重链 V 基因被结合到如前所述的(Sun, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218(1987))在表达载体中的人 κ 和 G4 恒定区基因中。 pSV184ΔHneo17-1AV_κhC_κ 的 17-1A V_κ HindIII 片段被用与来自于 7E3 的推断的轻链可变区基因相应的 6.0kb HindIII 片段所取代。相似的 pSV2ΔHgpt17-1AV_H-hC_{G4} 的 17-1A V_H EcoRI 片段被用与来自于 7E3 的推断的重链 V 区基因相应的 3.5kb EcoRI 片段所取代。所得到的质粒，被命名为 p7E3V_κh$C_{H\kappa}$ 和 p7E3V_HhC_{G4}，如图 2 所示。

为了表达嵌合重链和轻链基因，将这两个质粒共转染到非生产型小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 中。轻链质粒具有对 G418 的抗性，重链质粒具有对霉酚酸的抗性，因此使得它们可以对含有从每一个质粒来的表达基因的克隆进行筛选。具有对 G418 和霉酚酸抗性的克隆被扩展到稳定的细胞系中并保持在有这两种药物的条件下。对从这些细胞系来的组织培养上清液测试抗体，使用的是颗粒浓度荧光免疫分析法，山羊抗人 IgG Fc 抗体包被的聚苯乙烯珠粒和被荧光素标记的同种抗体。在被检测的最初 10 个细胞系中有一个产生大约 2μg/ml 抗体的细胞系(命名为 c-7E3F6)被选来用于进一步研究。

血小板结合活性的检测

在用蛋白质 A 琼脂糖柱对 c-7E3F6 进行提纯后，对抗体进行浓缩并用血小板结合活性检测法与鼠 7E3 IgG 进行比较。图 3 表示的是鼠 7E3 和 c-7E3F6(推断的嵌合抗体)同放射性标记的 7E3 竞争与血小板同等程度的结合。结合曲线表明鼠 7E3 和嵌合 7E3 在这一标准下的结合特性是相等的。

c-7E3F6 对血小板凝聚的抑制

纯化的 c-7E3F6 与鼠 7E3 用测量受试抗体对人血小板凝聚的抑制力的功能性检测来进行比较。其检测的结果列于表 4 中，表明这两种抗体在同样浓度下对胶原引起的血小板凝聚的抑制程度是相等的。 c-7E3F6 还对 ADP 引起的血小板凝聚具有相似的抑制能力。

血小板结合检测以及抑制血小板凝聚的检测表明：(1)正确的可变区基因确实被从 7E3 杂交瘤克隆出来；(2)用人恒定区取代鼠恒定区并没有对 7E3 可变区的结合和功能特性造成任何影响，正如这些检测所示。

纤维蛋白原包被的珠粒检测

嵌合 c-7E3F6 抗体在定量性、功能性的检测中,即测定抗体抑制血小板同纤维蛋白原包被的珠粒的凝集的检测中被发现是阳性的。 Coller, B. et al. (1983) J. Clin. Invest. 73:325-338 。

实施例 2

嵌合 IgG1 和 IgG3 的生产

对于从鼠 7E3 抗体来的重链的可变区进行编码的 DNA 碎片通过以相应的 7E3 可变区片段取代 17-1A 重链或轻链可变区片段而连接到在表达载体 pSV2ΔHgpt17-1AV$_H$-hC$_{G1}$ 和 pSV2ΔHgpt17-1AV$_H$-hC$_{G3}$(Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218(1987))上存在的人γ1 和γ3 恒定区。所得到的嵌合重链基因与嵌合轻链基因被共转染到 SP2/0 细胞中,以获得分泌γ1,K 和γ3,K 抗体的稳定细胞系。

实施例 3

对嵌合 7E3 Fab 在人体应用上的初步研究

制备嵌合 7E3 Fab 片段

嵌合 7E3(c7E3) Fab 片段的生产是用蛋白水解酶如木瓜蛋白酶对纯化的嵌合 7E3 IgG(γ1 重链，κ轻链)进行酶消化来完成的。用一系列设计的纯化步骤，即生产不含其它的消化的片段和污染成分(例如，蛋白质,核酸,病毒)的纯化步骤来分离 Fab 片段。最后的产品是一种无菌的非热原溶液，含有 2 mg 单克隆嵌合 7E3 Fab/ml 0.15M 氯化钠，0.01M 磷酸钠，pH7.2。在某些制剂中，包含有最终浓度为 0.001%(W/V)的多乙氧基醚 80。使用前用 0.22 微米低蛋白结合过滤器进行过滤。产品储存于 2-8℃。

药物动力学：c7E3 Fab 在人体血浆中的消失

人体血浆中的消失是在三个患有稳定的冠心病的患者中进行的。用 5 分钟静脉渗透给药 0.20-mg/kg 的 c7E3 Fab，在给药后的 2 分钟起至 72 小时收取血样。可预见的是有一部分的抗体以非结合态存在于血浆中。为了对这些非结合的抗体成分进行定量，要尽快地将血浆与血小板分离开来以防止在体外的进一步结合。用固相酶免疫分析法(EIA)检测血浆中游离的 c7E3 Fab 浓度。在该检测中，从兔抗血清中提纯的抗鼠 7E3 IgG 亲和性分离物被用于固相捕捉，同时还使用了在同样的兔抗体 7E3 抗体制剂的生物素化的衍生物的基础上建立的检测体系。其结果列于表 1。

表 1

在用 0.20mg/kg 剂量处理过的患者的血浆中的 c7E3 Fab 浓度

	c7E3 Fab（μg/mL）		
时间*	患者 A	患者 B	患者 C
给药前	ND	ND	ND
2 分钟	NA	2.554	2.312
5 分钟	1.149	1.873	1.411
10 分钟	0.713	1.331	1.111
15 分钟	0.610	0.916	0.852
20 分钟	0.499	0.985	0.756
30 分钟	0.463	0.815	0.515
45 分钟	0.340	0.704	0.405
1 小时	0.308	0.436	0.195
2 小时	0.288	0.262	0.149
6 小时	0.203	0.095	0.105
12 小时	0.112	0.072	0.064
24 小时	0.065	0.058	0.053
48 小时	0.055	0.147	0.174
72 小时	0.196	ND	0.076

* 给药与抽血的时间间隔。注意，在血被抽出来以后血小板还与血浆有额外的 2 分钟接触时间(即用离心方法对血浆的分离时间)。

ND = 未检测出/低于检测的最低检测水平(0.025μg/mL)。

NA = 未获得。

如果将整个注射的 7E3 作为血浆中的游离抗体进行检测，则抗体浓度的理论最大值就为大约 5.00μg/mL(0.20mg/kg 除以 40mL 血浆/kg)。然而，这一理论最大浓度是永远无法获得的，因为在注射的抗体中有很大一部分与血小板相结合了。事实上，在最早的那一次测定(2 分钟)时，血浆中平均 c7E3 Fab 浓度(n = 2)是 2.43μg/mL，这一数

值是实测的最大血浆浓度(C_{max})。在注射后的按时间顺序抽取的血样中的测定值显示了血浆中 c7E3 Fab 浓度的迅速下降。在 1 小时和 24 小时的测定值显示了在血浆(n = 3)中残存的被注射的抗体的浓度分别小于 0.5μg/mL 和 0.1μg/mL 。在图 5 中是血浆抗体浓度(ng/mL)对时间的点阵图，以图表的形式显示了在得自所有 3 个患者的血浆中 c7E3 Fab 的迅速消失。

对 c7E3 Fab 片段的药物动力学特性进行了初步的分析。对获得的血浆浓度的数据使用了几种不同的模型，包括几种混合的(随机和固定效果)线性模型以及标准的两室模型和不分室模型。血浆游离抗体的数据与标准的药物动力学模型并不符合。由于对 c7E3 Fab 的作用点是在血小板的受体上，游离抗体的血浆浓度与其作用点处的浓度不发生任何直接的联系这一结果并不是无法预见的。 c7E3 Fab 在血浆中的迅速消失，部分上反应了抗体与血小板的 GPIIb/IIIa 受体的迅速结合。在所检测的模型中随机效果线性模型与血浆浓度的数据最相吻合。使用这一模型获得了药物动力学参数 Cl_p, V_d 和 $t_{1/2}$ 的初步值,并列于表 2 。

表 2

c7E3 Fab* 的药物动力学数值

参数	数值
Cl_p(份数/小时)	15.6
V_d(L)	6.8
$t_{1/2}$(小时)	0.1(6 分钟)

* 使用了随机效果线性模型对数据进行处理。

Cl_p = 在血浆中的消失被定义为血浆浓度的下降除以该浓度的比率并被计算为每小时的速率，即如果在某一时刻的速率延续一小时，则计算的速率就将是在那一小时内去除的药物的份数。

V_d = 体积分布被定义为所给药的剂量除以测定的血浆浓度与血浆体积的乘积。计算中对体重为 70 公斤的人选用 3 升血浆体积。

$t_{1/2}$ = 半消除期。

人体尿样的检测

3 名稳定的冠心病患者以静脉注射 0.25-mg/kg c7E3 Fab 后，收集他们的尿样(这三名患者的血浆消失数据如上所述)。按以下的注射后的时间收取他们的尿样： 0 — 2 小时， 2 — 6 小时， 6 — 12 小时， 12 — 24 小时。此外，还收集了给药前的尿样。用对如上所述 EIA 进行了稍微修饰的方法在所收取的尿样的选样中测定游离的 7E3 Fab 。在所有的案例中，都没有在尿样中检测到 c7E3 Fab 。

基础毒理学

基础毒理学的研究是用嵌合 7E3 Fab 在 18 只猴子(Cyonomolgus 属和猕猴属)中进行的。浓缩药丸剂量上至 0.6mg/kg,然后渗透上至 0.8μg/kg/分，共 96 小时(包括对肝素,阿斯匹林和重组的组织血纤维蛋白溶酶原激活子的研究)。在所有的猴子中、所有的剂量内以及所有的组合情况下,7E3 都是安全的,并且完全都是可以忍受的,没有任何显著的失血并发症或其它的有害反应。

在稳定的心绞痛患者中的嵌合 7E3 Fab 的剂量阶梯

剂量梯度的研究是在 52 名停止接受抗血小板治疗 10 天以上的稳定的心绞痛患者(男,43 ～ 75 岁)中进行的。使用了不同的剂量。这些患者要么接受了一次性静脉注射 0.15 ～ 0.30mg/kg 嵌合 7E3 Fab(20 名患者)，要么是接受一次性浓缩药丸,然后以 12 ～ 96 小时进行静脉渗透(*10*μg/分)(32 名患者)。

在使用了浓缩丸剂 c7E3 Fab(0.15 — 0.30mg/kg)两小时后，确定血小板 GPIIb/IIIa 受体的封闭，对 20μM ADP(拮抗剂)反应的血小板凝聚，以及失血时间。受体封闭和作为对拮抗剂反应的血小板凝聚是按照以上所述确定的(Gold H.K. et al., J.Clin. Invest. 86:651-659(1990))。失血时间是用 Simplate 方法进行确定的。正如受体封闭的百分数(由可利用的受体结合位点来确定)所指出的，随着所用剂量的提高,对受体的封闭也逐步提高。在受体封闭增高的同时，相伴随的还有对血小板凝聚抑制(以给药前的数值或基线为准的百分数)的升高，以及失血时间的增长。

在所有三个参数中的峰值都是在 0.25mg/kg 观察到的。这一剂量相应的血浆浓度为 5μg/ml ，即在集合度计的小杯中有升高了浓度的嵌合 7E3 Fab 存在时对正常人体的富含血小板的血浆保育 15 分钟后观察到抑制峰值的浓度。(从正常人体来的血浆的凝聚程度是用穿过小杯的光量的百分数来决定的。在加入拮抗剂之前，血浆相对来说是不透明的，将此时的透光量的百分数定为 0 点。当把拮抗剂 ADP 加入到不含抗体的对照样品中时，随着凝聚的发生，透光量就逐渐提高。然而，当有 c7E3 Fab 存在时就观察到了由剂量引起的对凝聚的封闭，并且完全抑制由 5μg/ml c7E3 Fab 产生。)

对受体的封闭，失血时间以及血小板凝聚的抑制的期间进行了确定。在两小时处观察到了受体封闭,血小板凝聚以及失血时间的峰值，并且是随着时间而逐渐回复的。在 6～12 小时内失血时间回到接近正常值处。

由于受体封闭和功能性抑制的峰值是以 0.25mg/kg 获得的，所以对该剂量的药物进行连续渗透所造成的血小板抑制的期间进行了检测以确定血小板抑制的期间是否可以被延长。在 5 名接受了 0.25mg/kg 给药并以 10μg/分连续 72 小时渗透嵌合 7E3 Fab 的患者中，受体封闭、血小板凝聚的抑制以及失血时间的延长的程度都在整个连续渗透的期间内保持不变,一旦连续渗透被中断,就开始发生回复现象。在 12,24,48 和 96 小时的渗透中也发生了同样的结果。

没有任何一个患者发生了过敏反应。没有与这种处理相关的在血液学和化学实验数值上的显著变化。也没有任何严重失血现象发生。非显著的失血现象是很少见的，仅在那些患有牙周病的患者中出现了轻微的牙龈渗血以及轻微的鼻出血。这一实验的结果表明，嵌合 7E3 Fab 可以按剂量对患者给药，产生对血小板的抑制长达几天的效果。

<u>免疫原性结果</u>

在鼠 7E3 $F(ab')_2$和 Fab 的实验中(150 名患者)，用敏感性酶联免疫分析系统对免疫反应进行了检测，发现 16 %的患者(24/150)发生免疫反应。所有的反应都是低效价的，典型的范围是 1:50 到 1:200 。在受试组内包括用 0.01 — 0.25mg/kg 鼠 7E3

$F(ab')_2$处理过的正常的自愿者，用 0.05 — 0.20mg/kg 鼠 7E3 $F(ab')_2$处理过的非顽固性心绞痛患者，用 0.1mg/kg 鼠 7E3 $F(ab')_2$或 0.15 — 0.35mg/kg 鼠 Fab 处理过的 PTCA 患者，以及分别用一次性静脉注射 0.01 — 0.30mg/kg 鼠 7E3 Fab 处理过的、一次性给药 0.25 或 0.30mg/kg 然后连续渗透 12 ～ 36 小时(0.15μg/kg/分或 10μg/分)鼠 Fab 或按 6 小时间隔两次注射鼠 Fab(一次给药 0.2mg/kg — 0.30mg/kg ，随后以 0.05mg/kg 第二次给药)的顽固型心绞痛患者。

用人-鼠嵌合 7E3 Fab 可以明显地降低免疫原性。在 52 名患有顽固型心绞痛并用嵌合 7E3 Fab 处理过(如上所述)的剂量梯度研究中的患者身上没有显示出免疫反应，其确定方法是与对嵌合 Fab 相似的检测法。

抗血小板活性的逆转性

嵌合 7E3 Fab(γ_1, κ)从血小板上脱落的速率比较慢，血浆中游离的嵌合 7E3 Fab 从循环系统中可以迅速地消失(如上所述)。因此，嵌合 7E3 的抗血小板效果可以由使用随机供者的血小板来逆转。这种由转输血小板而引起的逆转或解毒效应在 2 名接受了鼠 Fab 或嵌合 Fab 并在接近对血小板凝聚达到完全抑制的时候又接受了随机供体血小板的患者中得到证实。对血小板功能的恢复是由测量失血时间来测定的。这一性质对于因为失血而需要进行对血小板功能恢复的患者是非常有用的。

实施例 4

用嵌合 7E3 抗体在选择性冠心血管成形术中防止血栓并发症

经皮经腔冠心血管成形术(PTCA)，例如使用气囊泵或冠状动脉瘥块切除(atherectomy)的 PTCA 是一种有效的使狭窄的冠心动脉腔扩张的方法。在这一过程中，在进行血管成形术之中和之后都伴随着固有的急性冠心血管闭塞的危险。报导的冠心闭塞的发生率在选择性血管成形术的案例中为大约 3%～ 6%(Detre, K.M. et al., Circulation 82:739-750(1991))，并且是在医院中发病和死亡的主要因素。在危险性高的患者中由血栓引起的重大心肌病症发生率是 10 — 20%。

在冠心血管成形术之中或紧随其后而发生的急性冠心闭塞的原因看起来是由于对动脉血管壁的深度损伤以及由此而产生的伴有或不伴有血栓的部分闭塞性“内膜瓣(intimal flaps)”、或在血管壁损伤的部位的血栓而共同造成的。在动物中，在进行了成功的血栓溶解之后而发生的再次闭塞都有在以前发生过周期性的冠心血管流量的降低和恢复，即称作“周期流量变化”（ CFVs ）的病史。这些 CFVs 几乎完全是一种血小板调控的现象，其原因是血小板凝聚物在冠心狭窄处和内皮损伤处的重复性聚集和脱落。在人体中也发现了在冠心血管成形术后出现的周期流量变化。在血管成形术中可以用嵌合 7E3 抗体抑制血小板的功能并进而防止血小板的凝聚和血栓。嵌合 7E3 抗体在那些有高度发生血栓危险的病人中是特别有用的。这些患者可以根据解剖学（例如血管造影术对狭窄位点的损伤的特性的确定）或临床的那些预示着急性冠心血栓和那些产生急性心肌梗塞、非顽固性心绞痛或突发性堵塞综合症的危险征兆（例如心肌梗塞，非顽固性心绞痛，糖尿病， 65 岁以上的妇女）来确诊。

在选择性 PTCA 中的嵌合抗血小板抗体

本试验是分两阶段进行的。第一阶段的主要目的是确定在进行了选择性经皮经腔冠状动脉成形术（ PTCA ）的患者中嵌合 7E3 Fab 的最佳一次剂量和其安全性。进行第二阶段试验是为了评价将嵌合 7E3(c7E3)作为浓缩丸剂进行渗透并紧接着进行不同连续期间的渗透的安全性及前期效率。第二阶段研究中的患者是接受了选择性冠状动脉成形术并且有高度局部心肌缺血并发症危险的患者。高度危险的患者包括那些带有 B 型或 C 型损伤特性的非顽固性心绞痛和顽固型冠心病的患者。表 3 给出了确定高度危险患者的标准，表 4 给出了血管造影学的损伤特征的定义。前期效率是由对血小板的抑制以及防止血栓并发症的功能而测定的。在本实验的两个阶段之中，可选用的对象是 18 － 76 岁的男性以及 18 － 76 岁的不具怀孕潜力的女性。

表 3

具有高度局部缺血并发症危险的患者的选择标准

中等程度的高度危险

1）不具有所定义的损伤特异特征的非顽固性心绞痛。

2）具有单一 B 损伤特异特征的狭窄。

最高危险

1）带有≥ 2 个 B 型损伤特异性特征的狭窄。

2）带有至少一个 B 型损伤特异特征的狭窄的非顽固性心绞痛。

3）带有至少一个 B 型损伤特异特征的狭窄的糖尿病。

4）带有至少一个 B 型损伤特异特征的狭窄的≥ 65 岁的女性。

5）带有至少一个 C 型损伤特异特征的狭窄。

表 4

损伤特异特征

A 型损伤（高成功率，＞ 85 %；低危险）	
－稀疏的（＜ 10mm 长度）	－没有或几乎没有被钙化
－同心的	－并非完全闭塞的
－可接触的	－不在口部的
－非尖角的碎片，＜ 45°	－不涉及主要支管
－平滑轮廓的	－没有血栓
B 型损伤（中等成功率， 60 － 85 %；中等危险）	
－管状（ 10 － 20mm 长度）	－中度－重度钙化
－偏心的	－完全闭塞 ＜ 3 个月
－近端中等弯曲的碎片	－位于口部
－中等角度的碎片，＞ 45°，＜ 90°	－分叉的损伤，需要两条导线
－非规则轮廓	－有一些血栓存在
C 型损伤（低成功率，＜ 60 %；高危险）	
－弥散	－完全闭塞，＞ 3 个月
－近端极度弯曲的碎片	－不能保护主要侧枝
－极度尖角的碎片，＞ 90°	－带有脆性损伤的变性的静脉移植物

第一阶段

在第一阶段，将患者分组接受一次剂量静脉注射嵌合 7E3 （γ_1, κ） Fab 片段（按实施例 3 的描述制备的和配方的）。对一共 15 名患者（ 3 女 12 男）进行了治疗，病人的平均年龄是 62 岁（ 46 － 76 岁）。在表 5A 和表 5B 中对所有一次剂量的患者和在单个剂量组内的患者给出了人口学的轮廓。

在剂量梯度方案中，有 5 名患者（ n = 5 ）在进行选择性 PTCA 之前约 30 分钟时接受了单一剂量的 0.15mg/kg， 0.20mg/kg， 0.25mg/kg 的 c7E3 Fab 。在此程序中，所有的患者都接受了阿斯匹林（标准剂量）并用肝素（标准剂量）进行了充分的抗凝集治疗。

虽然， PTCA 程序对第一阶段的病人被划分为选择性的， 15 个患者中的 6 个患有非顽固性静止心绞痛(unstable rest angina)。进行冠心扩张的部位总结于表 6 （底部）。 15 名第一阶段患者中的 7 名接受了在单一血管中一个损伤的 PTCA， 6 名接受了在单一血管中多个损伤的 PTCA， 2 名接受了在多条血管中的 PTCA （表 6 ）。

为了获得最佳单一剂量 c7E3 的效率标准被预测定义为在进行渗透 2 小时后达到下列平均值的最低剂量：（ 1 ）将失血时间延长了至少 20 分钟；（ 2 ）对 GPIIb/IIIa 受体进行了封闭使得基线位点受体的 80 %以上被封闭；和（ 3 ）作为对 20μM ADP 的反应，对血小板凝聚的抑制≤基线的 20%。

表 5A

嵌合 7E3 抗血小板抗体

按年龄、体重、身高、性别和种族对病人的分类

	连续	对照	单一剂量
全部患者	32	9	15
年龄			
平均值	57.4	54.2	60.1
中间值	57.0	56.0	62.0
最小值	38	37	46
最大值	76	74	76
标准偏差	9.7	10.5	9.7
体重(kg)			
平均值	82.8	88.2	85.5
中间值	84.8	84.2	84.0
最小值	42.3	67.3	70.5
最大值	113.0	122.7	107.0
标准偏差	16.6	19.0	11.1
身高(cm)			
平均值	171.2	176.7	173.6
中间值	172.8	177.8	175.2
最小值	152.4	157.5	160.0
最大值	185.0	185.4	188.0
标准偏差	7.9	8.8	7.8
性别			
女性	8	1	3
男性	24	8	12
种族	0	0	1
白人	26	8	11
黑人	5	1	2
亚洲人	0	0	1
西班牙裔	1	0	0

表 5B

嵌合 7E3 抗血小板抗体
基于年龄、体重、身高、性别和种族的患者分级

	7E3* 0.15mg/kg 7E3	7E3* 0.20mg/kg 7E3	0.25mg/kg 7E3	0.25 mg/kg 10 mcg/分钟 6 小时	0.25 mg/kg 10 mcg/mg 12 小时	0.25 mg/kg 7E3* 10 mcg/分钟 24 小时	安慰剂
全体患者	5	5	5	11	11	10	9
年龄							
平均值	60.6	57.2	62.6	59.1	55.0	58.1	54.2
中间值	63.0	56.0	65.0	60.0	53.0	58.5	58.0
最小值	47	46	51	40	42	38	37
最大值	73	68	76	76	73	75	74
标准偏差	10.5	8.3	11.3	10.5	8.9	10.3	10.5
体重（kg）							
平均值	83.8	80.5	92.2	85.8	83.8	78.3	88.2
中间值	76.3	78.0	96.0	89.0	85.0	79.9	84.2
最小值	74.5	70.5	82.0	60.4	42.3	62.3	67.3
最大值	107.0	95.0	99.1	113.0	111.8	95.0	122.7
标准偏差	13.8	9.5	7.7	17.8	19.6	10.7	19.0
身高（cm）							
平均值	170.8	171.9	178.1	169.3	170.9	173.7	176.7
中间值	173.0	175.2	177.8	167.6	172.7	175.2	177.8
最小值	160.0	160.8	169.0	157.5	152.4	165.1	157.5
最大值	177.8	182.9	188.0	177.8	185.0	180.3	185.4
标准偏差	7.0	8.8	7.0	6.4	10.8	5.4	8.8
性别							
女性	3	0	0	3	4	1	1
男性	2	5	5	8	7	9	8
种族							
	0	0	1	0	0	0	0
白人	3	4	4	8	9	9	8
黑人	2	0	0	3	2	0	1
亚洲人	0	1	0	0	0	0	0
西班牙裔	0	0	0	0	0	1	0

表6

血管造影特性

被治疗的损伤的数目:

	对照	c7E3 Fab 第一阶段	c7E3 Fab 第二阶段
单一血管/单一损伤	8	7	21
单一血管/多重损伤	0	6	7
多重血管/单一损伤	1	2	1
多重血管/多重损伤	0	0	2
未知	0	0	1
被治疗的损伤的位置:			
RCA	3	9	13
LCX	4	3	14
LAD	3	9	17

* 在患有多重血管疾病的患者中,计数每一条血管。

RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

第二阶段

在第二阶段中，患者被给予 0.25mg/kg 浓缩丸剂，然后连续滲透 10μg/分 c7E3 Fab 6 、 12 或 24 小时。受试组中的 32 名患者（ 8 女， 24 男）参加了第二阶段的研究。接受 c7E3 Fab 处理的患者的平均年龄是 57 岁（范围是 38 ～ 76 岁）有 9 名患者（ 1 女， 8 男）作为对照参加了本试验。对照组患者的平均年龄是 56 岁（范围是 37 ～ 74 岁）。对照患者是如上所述的高危险患者，不接受 c7E3 的治疗，但是按照接

受 c7E3 的患者一样被监测。在表 5A 和表 5B 中列出了所有第二阶段的患者以及各接受单一剂量处理组的患者的人口学轮廓。

在进行 PTCA 的气囊扩张之前 30 分钟用 c7E3 Fab 给药。阿斯匹林和肝素是按照临床标准给药，并参考在进行了血管成形术后肝素的用量应该是每小时 800 单位。各有 11 名患者分别进入到 6 小时和 12 小时的组内，有 10 名患者进入 24 小时的组内。

在 32 名接受了 c7E3 Fab 治疗的患者中，有 21 名患者经历了在单一血管内有一个损伤的 PTCA， 7 名患者接受了在单一血管中多重损伤的 PTCA，有 3 名患者接受了多重血管的 PTCA （表 6 ）。有一名患者的 PTCA 的种类并没有具体确定。在第二阶段受试患者中的冠心扩张位置总结于表 6 。在 9 名对照患者中， 8 名接受了单一血管内一个损伤的 PTCA，一名接受了多种血管的 PTCA 。这 32 名接受了 c7E3 Fab 治疗的患者和 9 名对照患者都具有那些能够使他们被划分为对 PTCA 有高度局部缺血心肌并发症危险的临床和血管造影特征。有 2 名接受 c7E3 Fab 治疗的患者和一名对照患者具有未确定的危险因素。剩下的 30 名接受 c7E3 Fab 治疗的患者和 8 名对照患者都具有至少一种使他们被划分为有高度局部缺血并发症危险的临床或血管造影特征，而且其中的大多数都具有一种以上的危险特征。表 7 中总结的是用于对照和 c7E3 处理组的危险因素，而对各剂量组内的每一患者的危险因素则列于表 8A —表 8D 。

表 7

高危险特性

第二阶段

危险因素	对照 (n=9)	c7E3 治疗 (n=32)
一种 B 型特性	5[1]	4
两种或两种以上 B 型特性	1[2]	7[3]
一种 C 型特性	0	2
无被鉴定的损伤特性的非顽固性绞痛	1	1[4]
非顽固性绞痛＋ B 型特性	0	8[5]
非顽固性绞痛＋≥ 2 个 B 型特性	1	7[6]
非顽固性绞痛＋ C 型特性	0	1
未指定的危险特性	1	2

1 编号为 04-006 的患有糖尿病的患者。

2 编号为 04-007 的患有糖尿病的患者。

3 编号为 03-001 与 02-007 的患有糖尿病的患者。

4 患者 04-004 除糖尿病外，还带有以下额外的危险因素：女性，年龄＞ 65 。

5 编号为 03-003 与 05-001 的患有糖尿病的患者。

6 患者 01-018 除糖尿病外，还带有以下额外的危险因素：女性，年龄＞ 65；编号为 03-002 的患有糖尿病的患者。

表 8A

素因性高危险特性

对照患者

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
01-023	1．非顽固性绞痛	LAD
01-024	1．一个 B 型特性[3]	LAD
04-006	1．糖尿病	LCX
	2．一个 B 型特性(偏心的)	
04-007	1．糖尿病	RCA
	2．两个 B 型特性(偏心的,角度缓和的碎片;＞ 45°,＜ 90°)	
04-008	1．一个 B 型特性(偏心的)	LCX
04-009	1．一个 B 型特性(偏心的)	LCX
01-021	1．一个 B 型特性[3]	RCA
01-022	1．非顽固性绞痛	OM
	2．两个 B 型特性(管状；不正规轮廓)	
03-005	1．未确定的危险特性	RCA

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

OM = LCX 的钝的边缘的分支

[3] 未确定的特性

表 8B

素因性高危险特性

6 小时持续渗透

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
04-001	1．非顽固性绞痛 2．一个 B 型特性(偏心的)	RCA
06-001	1．非顽固性绞痛 2．一个 B 型特性(血栓)	LCX
06-002	1．一个 B 型特性 (管状[10 至 20mm 损伤])	LAD
01-014	1．非顽固性绞痛 2．一个 C 型特性(弥散＞ 2cm 长度)	LAD
01-013	1．非顽固性绞痛 2．两个 B 型特性(偏心的,一些血栓)	RCA
01-015	1．二个或更多个 B 型特性[3]	LAD， LADD
01-017	1．一个 B 型特性(偏心的)	LCX
02-005	1．非顽固性绞痛 2．三个 B 型特性(管状,(10 至 20mm 长度)； 不正规轮廓；口部)	LAD

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

LADD = LAD 的对角线分支

[3] 未确定的特性

表 8B(续)

素因性高危险特性

6 小时持续渗透(续)

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
03-001	1．糖尿病	LAD
	2．四个 B 型特性(偏心的,角度缓,＞45°,＜90°;不正规轮廓;中度至重度钙化)	
01-012	1．一个 C 型特性(弥散＞2cm 长度)	LAD
01-016	1．一个 B 型特性(一些血栓)	RCA
		OM_n

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

OM_n = LCX 的钝的边缘的分支

表 8C

素因性高危险特性

12 小时持续渗透

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
01-018	1．非顽固性绞痛	OM_n
	2． 65 岁以上女性	
	2．两个或两个以上 B 型特性	
01-019	1．非顽固性绞痛	回旋
	2．两个或两个以上 B 型特性	
02-006	1．非顽固性绞痛	RCA
	2．一个 B 型特性(完全闭塞＜ 3 个月)	
02-007	1．糖尿病	LCX
	2．五个 B 型特性(偏心的,近端片段的中度弯曲；角度缓和的片段,＞ 45°,＜ 90°；需要双重导线的分叉损伤；完全闭塞＜ 3 个月)	OM_1， LADD
03-002	1．非顽固性绞痛	LAD
	2．糖尿病	
	2．两个 B 型特性(中度弯曲片段,不正规轮廓)	
03-003	1．非顽固性绞痛	RCA
	2．糖尿病	
	2．一个 B 型特性(不正规轮廓)	

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

OM_n = LCX 的钝的边缘的分支

表 8C(续)

素因性高危险特性

12 小时持续渗透(续)

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
05-001	1．非顽固性绞痛	LADD
	2．糖尿病	RCA
	3．一个 B 型特性[3](偏心性)	
05-002	1．一个 B 型特性(管状)	RCA
	2．一个 C 型特性	LADD
	(完全闭塞＞3 个月)	
05-003	1．两个 B 型特性	LAD
	(角度缓和的片段,＞45°,＜90°；一些血栓)	
06-003	1．非顽固性绞痛	RCA
	2．一个 B 型特性(一些血栓)	
04-002	1．非顽固性绞痛	LCX
	2．一个 B 型特性(10 至 20mm 管状的)	

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

LADD = LAD 的对角线分支

OM_n = LCX 的钝的边缘的分支

[3] 未确定的特性

表 8D

素因性高危险特性

24 小时持续渗透

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
01-020	1．两个 B 型特性(不正规轮廓,一些血栓)	RCA
02-008	1．非顽固性绞痛	
	2． B 型特性	
	a)4 个特性(管状;偏心的;近端片段中度弯曲;不正规轮廓)	LCX
	b)3 个特性(偏心的;角度缓和的片段 > 45°, < 90°)	LCX
05-005	1．非顽固性绞痛	RCA
	2．一个 B 型特性[3]	
05-006	1．非顽固性绞痛	RCA
	2．一个 C 型特性	
	(弥散(> 2cm 长度))	
04-003	1．两个 B 型特性	LAD
	(偏心性;带有双重导线的分叉)	
04-004	1．非顽固性绞痛	LAD
	2．糖尿病	
	3． 65 岁以上女性	

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

LADD = LAD 的对角线分支

Om_n = LCX 的钝的边缘的分支

[3] 未确定的特性

表 8D(续)

素因性高危险特性

24 小时持续渗透

患者编号	危险类型(S)[1]	部位[2]
04-005	1．两个 B 型特性(偏心性,一些血栓)	RCA
02-009	1．非顽固性绞痛	
	2． B 型特性	
	a)3 个特性(不正规轮廓,一些血栓;需要双重导线的分叉损伤)	LAD
	b)1 个特性(需要双重导线的分叉损伤)	LAD
	c)2 个特性(偏心性;需要双重导线的分叉损伤)	DB
05-004	1．一个 B 型特性	OM_1
	(需要双重导线的分叉)	OM_2

[1] 列于表 3 和表 4 的潜在特性

[2] RCA = 右冠状动脉

LCX = 左回旋冠状动脉

LAD = 左前下冠状动脉

DB =

Om_n = LCX 的钝的边缘的分支

[3] 未确定的特性

对血小板功能的抑制（第一阶段的结果）

为了鉴定嵌合 7E3 Fab 对血小板功能的抑制活性，对 GPIIb/IIIa 受体结合位点的存在程度（记录为被封闭的 GPIIb/IIIa 的平均百分数），对由拮抗剂 20μM ADP 引起的血小板凝聚的抑制的平均值，以及平均失血时间进行了一系列的检测。对由拮抗剂引起的受体的封闭和血小板的凝聚的测定基本上按照如上所述进行（ Gold, H.K. et al., J.Clin. Invest., 86:651-659(1990)）。对于受体封闭的测定，在 0 时测定了受体的存在程度并将在此时所存在的受体数定义为被封闭受体为 0 %（基线）。其它时间点的数值都是相对于该基线或给药前的测量的受体存在数值。失血时间是用 Simplate 方法进行的。

图 6 总结的是在按单一浓缩药丸嵌合 7E3 Fab 给药之后 2 小时的剂量反应，以受体封闭（图 6A ），血小板凝聚（图 6B ）和失血时间（图 6C ）来表示。在图 6 中的实线表示的是在每一剂量组中的 5 名患者的平均值。随着 c7E3 Fab 剂量的提高，受体封闭也有逐步的提高，正如被封闭的受体的百分数所显示的那样（图 6A ）。在两小时处的受体封闭的平均数值对 0.15mg/kg 为 53.8%，对 0.20mg/kg 为 80.2%，对 0.25mg/kg 为 86.6%。受体封闭的增加伴随着有对血小板凝聚抑制的增加，以对给药前的数值的百分数表示（图 6B ）。在 2 小时处的平均血小板凝聚数值对 0.15mg/kg， 0.20mg/kg 和 0.25mg/kg 各组分别为基线值的 46.1%， 44.6%和 17.9%。同样，在进行了渗透后的 2 小时处也表现出与剂量有关的失血时间的延长（失血时间的测量仅取了 30 分钟，图 6C ）。失血时间对于 0.15mg/kg， 0.20mg/kg 和 0.25mg/kg 各剂量分别为 26.0 分钟， 27.5 分钟和 30 分钟。在所使用的条件下，以及根据这些检测所得到的结果，对于抗血小板活性的最佳剂量被确定为 0.25mg/kg 。

图 7 表示的是单次浓缩药丸剂量 0.25mg/kg 给药后的作用时间，在该剂量观测到最大的血小板效果。图中的线表示的是从 0 时（基线）到 24 小时的平均数值，如图在 X 轴上所示，上图表示的是对受体的封闭（图 7A ），中图表示的是对血小板凝聚（图 7B ）的结果，下图表示的是失血时间（图 7C ）。在两小时处见到了受体封闭，血小板

凝聚和失血时间的效果峰值，并随时间逐步回复。失血时间在 12 小时处回复到接近正常值。没有任何一个患者发生血小板减少症。

对血小板功能的抑制（第二阶段的结果）

在第二阶段中， GPIIb/IIIa 受体和血小板凝聚的数据并没有从所有患者中取得，在接受了 24 小时渗透的患者中，只从 2 名患者身上获取了这些数据。因此，只总结了 6 小时和 12 小时的数据。在 6 小时和 12 小时渗透的组内，受体封闭的平均值在整个渗透期间都保持在大于基线的 80 %的水平上。在 2 小时处， 6 小时和 12 小时渗透组内的 20μM ADP 引起的血小板凝聚的平均值分别为基线的 13 %和 15 %，并且， 12 小时组内则在整个渗透期间内都低于 25 %。对所有 3 个渗透期间的 2 小时平均失血时间都大于 30 分钟。图 8 给出的结果是在接受了 0.25mg/kg 剂量后又接受了 12 小时的 10μg/分的嵌合 7E3 Fab 连续渗透的患者的结果。 12 小时渗透所产生的结果在图 8 中由浅色区表示，线条表示的是平均值。在整个的渗透期间内，对受体的封闭程度，对血小板凝集的抑制程度以及对失血时间的延长都得到了保持，一旦中止了渗透则它们就开始恢复。

表 9

从图 8 中得出的平均数值

0.25mg/kg+10μg/分 12 小时

从起始渗透起计算的小时数	平均失血时间（分）	平均凝聚（%基线）	平均结合（%基线）
0	5.5	100	0.0
2	30	14.7	93.5
6	30	22.4	89.1
12	23.5	24.4	85.6
18	13.9	61.1	72.9
24	8.6	60.9	69.2
36	14.5	75.0	60.6

第一阶段和第二阶段患者的临床效果

在 47 名接受了 c7E3 Fab 治疗的患者中，没有任何一个人在 PTCA 的过程中或之后经历了血栓。在所有 47 名接受了 c7E3 治疗的人同中，除了 2 名以外，都成功地进行了 PTCA ，正如血管造影所确定的那样，将损伤减小到小于 50 %的血管直径。在两例不成功的扩张患者中， 01 － 012 接受了将左前下冠状动脉的由 90 %狭窄减少到 70 %的扩张，但是进一步的扩张是技术上无法实现的。第二名患者（患者 01 － 019 ），开始时进行了成功的扩张，但是随后又对主要的纵向解剖（没有明显的血栓）放置了冠心内的斯坦特（ stent ）。在 9 名对照人员中，有 1 名（ 01 － 022 ）在进程 15 分钟时发生了急性血栓封闭，需要进行紧急冠状动脉分流手术（ CABG ），并得到复原。其他 8 名的对照患者都得到了成功的扩张，使狭窄的部位被降低至 50%或更少。

患者 01 － 019 （ 12 小时渗透组）接受了气囊扩张，使左回旋冠状动脉的 95%的损伤被降低了 50%。其后，该患者经历了明显的血管迷走神经的异常，导致了心动过缓，低血压，短暂的心搏停止。它被送回到导管插入室并且进行了紧急的冠状动脉内斯坦特安装术。该斯坦特在左主冠状动脉发生了错位，该患者被送去进行了紧急的冠心动脉分流手术。根据调查的结果，没有患冠心内血栓的明显迹象，不论是在血管造影中或是手术期中都是如此。该名患者还发生了周期发作的(peri-operative)心肌梗塞。术后 8 天该患者脱离危险并恢复。

有 3 名接受 c7E3 Fab 治疗的患者各自分别患有 PTCA 术后的胸部疼痛，程度并不一致。患者 01 － 009 （ 0.25mg/kg 单一剂量组）在 c7E3 处理后 9 小时后发生胸痛，患者 05 － 003 （ 12 小时渗透组）在接受了 c7E3 21 小时后发生了绞痛，患者 06 － 003 （ 12 小时渗透组）在接受 c7E3 处理 2 天后发生心绞痛。调查结果表明，这些胸痛的表现与标志着复发闭塞的局部缺血表征并不相关。

患者 02 － 004 （ 0.25mg/kg 单一剂量组）在接受 c7E3 Fab 治疗之前就患有长期的胸痛并在 PTCA 过程中继续有胸痛。在术后的那一天 ECG 的变化以及伴随着的心酶

（前一天抽取）的升高表明这位患者经历了周期性(peri-procedural)非 Q 波心肌梗塞（肌酸酐激酶峰值＝ 462， MB 分数＝ 64 ）。

在用 c7E3 Fab 处理的 52 天时，受试组中发生一例死亡。患者 06 － 002 （ 6 小时渗透组）患有间隙肺病，充血性心衰和非顽固性绞痛的病史，进行过成功的近左下冠状动脉的 PTCA 术。在试验过程中，该患者发生了持续性的心室纤维性颤动，两次需要电除颤，此后，试验进展顺利。当离开了导管室后，该患者又发生了蓝视（症），并立即给予利尿剂和输氧治疗。然而，该患者随后又发生了呼吸困难并需要呼吸辅助器。该患者随后在医院内的情况变得更为复杂，包括脓毒症、成年人呼吸系统压迫综合症、贫血（进行了多次输血）、心脏局部缺血。该名患者在 c7E3 Fab 治疗后的第 52 天死于多重系统功能衰竭。

安全性：第一阶段和第二阶段

图 9 表示的是所有剂量组的患者在渗透终止后的从基线到 24 小时的血细胞比容的绝对变化值。在图上标出了变化为 0 的一条参照线。对照组中的一名患者（ 01 － 022 ）以及一名 c7E3 Fab 治疗的患者（ 01 － 019 ）的血细胞比容的数据并没有在图中表示出来，因为这两名患者都在第一个 24 小时内需要进行紧急冠心分流手术并输血（见以下）。在-12 处的第二条低线表明根据心肌梗塞血栓溶解（ TIMI ）标准被定义为少量出血的所需血细胞比容的变化(Rao et al., J. Am. Coll. Cardiol. 11:1-11(1988))。在对照的病人和所有 c7E3 Fab 剂量组的病人之间的血细胞比容的变化是相似的。表 10 总结的是渗透终止后 24 小时血小板计数变化的平均值。血小板计数的变化在未接受治疗的对照组和 c7E3 Fab 治疗组中具有相似的分布，并没有明显的与剂量相关的效果。

表 10

渗透结束后 24 小时血小板计数平均变化值 %

剂量	% 变化	范围
对照（ n=9 ）	-0.7	(-20.2,+13.2)
0.15mg/kg(n=5)	-17.4	(-24.5,+19.5)
0.20mg/kg(n=5)	-11.6	(-20.8,+4.7)
0.25mg/kg(n=5)	+2.9	(-8.9,+4.4)
6 小时*(n=11)	-7.7	(-28.3,+19.4)
12 小时*(n=11)	0.0	(-24.3,+24.4)
24 小时*(n=10)	-3.9	(-9.0,+50.0)

* 注射浓缩药丸剂量 0.25mg/kg 后 c7E3 Fab(10μg/分)的渗透时间

对第一阶段和第二阶段结果的讨论

本研究的第一阶段结果表明， c7E3 在用阿斯匹林和肝素处理过的 PTCA 患者群中的剂量反应特征与在剂量阶梯试验（实施例 3 ）中的顽固性心绞痛患者中的特征是相同的。嵌合 7E3 产生了血小板 GPIIb/IIIa 受体的剂量依赖性封闭，并且这种受体封闭与对血小板功能的抑制相关。此外，第二阶段的结果表明，用连续渗透可以获得对血小板 Fab 功能长达 24 小时的抑制效果。在所有的患者中，不论其渗透时间长短，停止渗透后 6 － 12 小时就会发生血小板功能的恢复。

c7E3 处理的患者的临床结果，从血管造影学或临床终点的观点来看，都比根据它们的危险性的概况所预测的结果好得多。在 c7E3 处理的患者中，没有任何人在此过程之中或之后发生血栓。此外，除 2 名患者以外，其他的患者都进行了在血管造影学上为成功的治疗。所有进入第二阶段的患者以及进入第一阶段的 15 名患者中的 6 名都是

根据临床或血管造影特征而被定义为高危险性的患者。单个的临床特征（例如非顽固性绞痛，糖尿病，妇女年龄大于 65 岁）或血管造影的损伤特异性特征（例如 B 型或 C 型）都使患者发生并发症的危险性被提高，多重这些因素的效果是相加性的。

在第二阶段中，被处理的患者中的 17 名患有非顽固性心绞痛并带有或不带有另外的临床或血管造影损伤特异危险特征。此外，在第一阶段中的 6 名患者被确认具有非顽固性心绞痛。在公开的文献中，患有非顽固性心绞痛的患者发生重大并发症（死亡，心肌梗塞，急性冠心血管分流或重复性 PTCA ）的发生率为 10 %～ 15 %（ De Feyter, P.J.: Editorial. Am. Heart J. 118:860-868(1989)和 Rupprecht, H.J. et al. Eur Heart J. 11:964-973, (1990)）。血管造影特征同样是对 PTCA 综合症有高度预测性的(Ellis, S.G., 1990, "Elective coronary angioplasty: technigue and complications", In: Textbook of Interventional Cardiology, E.J. Topol, Ed., (W.B. Saunders Co., Philadelphia); De Feyter, P.J. et al., Circulation 83:927-936 (1991); Ellis, S.G. and Topol, E.J, Am. J. Cardiol. 66:932-937(1990); and ACC/AHA Task Force Report: Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty, J. Am. Coll. Cardiol. 12:529-545 (1988))。 29 名第二阶段 c7E3 处理的患者由于其损伤特异性特征而达到了该标准，其中的 12 名具有一个 B 型损伤， 14 名具有 2 个或更多个 B 型损伤， 3 名具有 C 型损伤。此外，在试验中的很多患者都接受了在一个或多个血管中的多重损伤的扩张，因此而增加了本程序的潜在危险性(Samson, M. et al., Am. Heart J. 120:1-12(1990))。根据这些患者的血管造影学定义的高度的危险因子的数目和程度，局部缺血并发症的预测发生率在 10 %～ 20 %的范围内(Ellis, S.G.: Elective coronary angioplasty: technique and complications, In: Textbook of Interventional Cardiology, (Ed. E.J. Topol), W.B. Saunders Co., philadelphia (1990); De Feyter, P.J., Circulation 83:927-936(1991); Ellis, S.G. and Topol, E.J, Am. J. Cardiol. 66:932-937(1990))。

对照组中同样包括高度危险的患者。然而，一般而言，对照组患者中的危险因子的数量和程度是较低的。 9 名对照患者中的 5 名具有单一的危险因子，即一个 B 型损伤

（4 名患者）或非顽固性绞痛（1 名患者），而 32 名第二阶段 c7E3 处理的患者中有 26 名具有 C 型损伤或两种甚至更多的高度危险特征。在这两组之间，危险程度上的不同是显著差异的(Fisher's exact test p = 0.018)。非常有趣的是，对照组中具有急性堵塞（患者 01 — 022，具有 2 个 B 型损伤特征的非顽固性绞痛）是被鉴定为具有多于一种危险因子的 3 名患者之一（有一名对照患者具有未确认的危险特征）。因此，当对照组 3 名高度危险患者中的一名发生了血栓时，而同属于这种最高危险性的 26 名经 c7E3 Fab 处理的患者中却没有任何一人发生血栓。

本研究还表明在那些已经接受了静脉注射肝素或口服阿斯匹林治疗的患者中可以获得用 c7E3 的安全有效的抗血小板效果。在对照组和 c7E3 处理的患者之间对比其失血现象，表明在各组的基线之间没有血细胞比容变化的明显差异。其它的副作用都不是经常发生的，而且是中等程度和比较缓和的。在整个试验中发生了一例死亡，而且是在 c7E3 Fab 治疗后几乎 2 个月时发生的，该患者患有间隙性肺病和心衰，并在 PTCA 后发生了呼吸困难且并发有脓毒病，成年人呼吸抑制综合症以及最后的多器官衰竭。

最终，在所有那些得到了结果的 20 名患者中没有任何一人发生了人抗嵌合抗体的免疫反应。

总而言之，嵌合 7E3 Fab 可以对那些接受了阿斯匹林及静脉注射肝素治疗的患者在进行 PTCA 时，产生安全有效的对血小板功能的抑制。这种抗血小板作用可以保持长达 24 小时，即不引起显著的失血危险性的增加，也不引起免疫系统的反应。在那些具有高度血栓并发症危险的患者中，在接受 c7E3 治疗的组内没有发生血栓现象。这就表明 c7E3 可以在这些患者中降低血栓并发症的危险。

实施例 5

在冠心血管成形术中治疗急性堵塞

在冠状动脉血管成形术中，急性冠状动脉堵塞是在这一手术中的决定其发病率和死亡率的主要因素，在选择性的血管成形术案例中大约为 3 %～ 6 %(Detre, K.M. et

al., Circulation 82:739-750(1991))，但是在那些因为非顽固性绞痛或发生了急性心肌梗塞而进行血管成形术的患者中的发生率高达 20%～ 40%(Ellis, S. G. et al., Circulation 77:372-379(1988); DeFeyter, P.J. et al., Circulation 83:927-936(1991))。发生急性堵塞的机制是在进行血管成形术时，在动脉上所创造的或所延展的内皮损伤区处发生的急性血栓而造成的。通常在这些位置由于血管的几何形状的变化而造成对血流形式的改变，一般都是由对斑块的改动而造成的，并且一般都有内皮下边的组织的暴露，例如内膜和中间切开的部分的暴露。因为在形成凝血的初期需要血小板的粘结和凝聚，所以嵌合 7E3 Fab 抗体片段被用来治疗在冠状动脉血管成形术时发生的急性冠状动脉堵塞。

案例

患者是一位年龄为 45 岁的男性医师，并且身体状况一直非常良好。在他接受血管成形术一周前开始发生胸部和颈部的不适。当这些病征持续数天并恶化后，他向其同事进行咨询。心电图（ EKG ）结果揭示出前心 T 波的倒转。该患者被送入当地医院的冠心病病房，静脉注射硝酸甘油和肝素，并口服阿斯匹林。在此后的 24 小时内对心异化酶进行了一系列的测定，并没有显示出超出正常范围。在此后的两天内数次心电图记录揭示了前心 T 波的持续性平缓，但是并没有发生导致心肌梗塞的变化。住院的第二天，患者被送到心脏导管室，由左心室造影术揭示了左心室功能在整体上是正常的，但在左心室壁上的前外侧有一个很小的运动减少区，同时在后下基底区也有一个运动减少区。左心室的泵血量为 72%。冠状动脉造影显示出以左侧为主的冠状动脉系统有一个很小的但是完全堵塞右冠状动脉的闭塞。在左侧前下冠状动脉（ LAD ）的中间部位有一个明显的狭窄。在该中间 LAD 狭窄处的远端有一个由此产生的斜向的很小的逐渐扩展的病灶。

该患者被送回到冠心病病房，并被连续静脉注射硝酸甘油和肝素 48 小时。在此期间内，他没有感到病痛，心异化酶没有升高，每日的心电图仅揭示出其前心 T 波的持续性平缓。随后该患者被转移到 Hermann 医院（ Houston, TX ）进行血管成形术。

在进行血管成形术前，该患者还继续接受静脉注射硝酸甘油和肝素，口服阿斯匹林，并且开始口服钙通道封闭剂。在以下的几天内，患者的部分促凝血酶原激酶的时间（PTT）是 70 － 90 秒。在开始对其进行血栓成形手术时，活化的血凝块时间（ACT）是 173 秒。给患者静脉注射肝素 5000 单位，患者的左冠状动脉口与一个 8 号 French JL 3.5 导向导管相接。用尾侧右前斜向投像和颅侧左前斜向投像观察该 LAD 冠状动脉，对 LAD 首先放置 0.018 英寸多普勒导线（Cardiometrics, Inc., Mountain View, CA）。我们经常使用这种导线对高度危险性急性堵塞患者的血流进行监测。从 LAD 相对于损伤的远端和近端记录到血流速度的信号。将一个 2.5mm 冠状动脉气囊导管（Intrepid, Baxter, Inc., Irvine, CA）通过多普勒导线送入，该多普勒导线是稳定在冠状动脉处的。将该气囊放置在跨骑在 LAD 损伤处的正确位置，然后对该气囊以 6 个大气压的压力进行系列性短暂的充气。这样就使得该狭窄的程度被降低，正如从血管造影上以及从血管流量峰值（APV）由 12cm/秒到 33cm/秒的升高所观察到的变化证实的那样。

在进行这种扩张以后几分钟的观察中，发现该流速信号开始消失。注射对比剂后显示了在该血管成形位点又发生了狭窄，即弹性回缩，斑点扭曲和形成了血栓。然后将气囊再次深入到该损伤位点，再次进行气囊扩张。使该动脉得到了再次扩展并使流速信号再次回到 APV 为 34cm/秒的水平。

在继续监视的几分钟内，该信号再次降低。在 5 分钟内，该信号已达到相当低的水平，平均峰值速度是 3cm/秒。患者开始感到胸痛。心电图对心前区电极的监视揭示了 ST 部分的升高。血管造影显示该动脉被彻底地闭塞了。在此之前几分钟所获得的活化凝血时间是 344 秒。

然后给予血小板 GPIIb/IIIa 受体（c7E3 Fab, γ_1, κ）的特异性嵌合 7E3 单克隆抗体 Fab 片段，剂量为 0.25mg/kg，1 分钟静脉注射。此后约 1 － 2 分钟，血流速度开始回升。注入对比剂后显示了该冠状动脉开放的流速已经被恢复并达到血栓溶解心肌梗塞试验的一级水平（TIMI 1）。在此后的 15 分钟期间内，冠状动脉流量继续回升并稳定在 APV 为 23cm/秒。以后又注射了几次对比剂，证明冠状动脉流量确实得到了改

善。患者的胸痛逐渐消失，由监测电极所产生的ST部分回到了其基线部分。

在使用了 c7E3 Fab 15 分钟后，按照要求进行了血管造影。其结果显示了 TIME 3 冠状动脉流动。此时的流速信号为 20cm/秒。在此后的 5 分钟连续观测中，没有发现冠状动脉流量的进一步改善。在此期间内的血管造影的录像确认了在该血管成形术位点处还有少量的血栓。因此，决定冠状动脉内注射 250,000 单位的尿激酶。这一血栓溶血剂在此后的大约 10 分钟内被渗透进去。在此期间内由多普勒导线测量确认在流速上没有进一步的改善。当冠状动脉内注射的尿激酶被完全渗透以后，即在使用了 c7E3 Fab 后的第 33 分钟时进行了再一次的冠状动脉血管造影。该动脉开放并达到 TIMI 3 水平的流动。在损伤位点还有一些中等程度的、残余的狭窄继续存在。此外，还可以观察到血栓的尺寸进一步缩小但并未被完全溶解。因此，决定再次进行气囊扩张术，以减少残存的狭窄。

气囊导管就再一次通过导线进入到损伤的位点，然后以 6 个大气压进行最后的气囊扩张 2 分钟。此后，抽出气囊导管，导线仍保留在原位置。流速信号升高到 APV 为 29cm/秒，并在此水平上保持数分钟。此后的血管造影证实了该残余狭窄被适当地减小了。然后将导线抽回到该狭窄的近端，并再一次的记录流速。抽出导线、气囊导管和导向导管。该程序彻底完成。

然后将该患者送回到冠心病病房。为了在未来的几天使他的 PTT 保持在 70 — 90 秒的范围内，继续给他口服阿斯匹林，硝酸盐以及钙通道封闭剂。此后的几次心电图（ EKG ）表明前心 T 波倒转得到了缓解，此后的所有 EKG 都是正常的。此后几次肌酸激酶(CK)异化酶值均为＜ 100 U/L 。在进行 PTCA 之前血小板的计数是 248,000 ，在接受了 c7E3 Fab 之后的 2 小时， 6 小时， 12 小时， 24 小时和 48 小时的血小板计数分别为 304,000 、 279,000 、 246,000 、 185,000 和 220,000 。由 10μM ADP 引起的血小板凝聚在术前由光密度计测定为 73%，在术后的 2 小时， 6 小时， 12 小时， 24 小时和 48 小时分别为 0 %、 13 %、 26 %、 45 %和 51 %。血管成形术后一个星期对患者进行了跟踪导管检测。其 LAD 冠状动脉是充分开放的并达到 TIMI 3 级流量。在当天的晚些时候允许他回家。

病历的讨论

该患者接受了 0.25mg/kg c7E3 Fab 的静脉注射，冠状动脉内 250,000 单位尿激酶注射以及多次的扩张治疗，成功地治疗了他的在冠状动脉血管扩张术中发生的突发堵塞引起的急性的局部冠状动脉缺血综合症。这些结果表明抑制血小板糖蛋白 IIb/IIIa 受体结合以及血小板交连的抗血小板治疗方法可以有效地帮助被急性闭塞的冠状动脉重新获得稳定的流通，并可以用于其它相似的临床病例。

实施例 6

防止高度危险血管成形术局部缺血并发症的
抗 GPIIb/IIIa 嵌合抗体片段的随机、双盲评价

概述

自从 1977 年出现了冠状动脉血管成形术后，经皮心肌血管再造术就得到了迅速的发展(Gruentzig, A.R. et al., N. Engl. J. Med., 316:1127-1132(1987))。虽然这些手术能够使局部缺血和生命的质量得到改善(Parisi,A.F. et al., N. Engl. J. Med., 326:10-16(1992))，急性并发症仍旧是其主要的缺陷。在医院的这些手术之中或其后发生的在被治疗的血管上的突然闭塞的发生率为 4%～ 9%，发生的重复闭塞及急性堵塞都相伴有相当数量的发病率以及大约 10 倍的死亡率的增加(Lincoff, A.M. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 19:926-938(1992); Tenaglia, A.N. et al., Am. J. Cardiol, In press (1993); Detre, K.M. et al., Circulation, 82:739-750(1990); Ellis, S.G. et al., Circulation, 77:372-379(1988))。尽管血管上发生突然堵塞的机制通常都是无法确定的，但是血栓的形成以及血管的创伤都是其形成因素。使患者被确认为具有高度急性并发症危险的特征，包括与冠状动脉血栓（非顽固性绞痛，急性的或近期的心肌梗塞）、糖尿病、女性及冠状动脉形态特征（弯曲点，血栓，分叉）相关的临床症状，表明患者损伤的复杂性的增加(Lincoff, A.M. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 19:926-938(1992); Ellis, S.G. et al., J. Am. Coll. Cardiol, 17:(Suppl B):89B-95B(1991); Moushmoush, B. et al., Cath.

Cardiovasc. Diagn., 27:97-103(1992); and Myler, R.K. et al., circulation, 82 (Suppl II):II-88-II-95(1990)。

尽管阿斯匹林已经显示出可以降低患者在接受血管成形术时发生急性血管堵塞和急性心肌梗塞的危险程度(Schwartz, L. et al., N. Engl. J. Med., 318:1714-1719(1988); Barnathon, E.S. et al., Circulation, 76:125-134(1987))。但是，它对血小板功能的作用相对来说较弱，而且在接受了阿斯匹林的那些高度危险的患者中继续发生局部失血的发生率为 10%～ 20%(Tenaglia, A.M. et al., J. Am. Coll. Cardiol., (1993, in press))。相反，对患者给予嵌合 7E3 抗体的 Fab 片段就获得了对 GPIIb/IIIa 受体的实质上的封闭，并且抑制了血小板的凝聚（见实施例 4，血小板功能的抑制）。

在对进行血管成形术的患者的初期研究中， c7E3 Fab 降低了在进行经皮手术之中或之后发生急性血管堵塞的危险性（见实施例 4 和 Ellis, S.G. et al., Cor. Art. Dis., 4:167-75(1993)）。现在进行的随机性的研究是为了进一步评价对 GPIIb/IIIa 受体为特异性的嵌合抗体片段在防止局部缺血并发症时的效率(EPIC 实验， c7E3 Fab 防止局部缺血并发症的评价)。特别是对 c7E3 Fab 在接受血管成形术的具有高度并发症危险的患者中的临床效果，用预期的、双盲的、安慰剂控制的、随机临床的实验进行了评价。该实验包括在 56 个地区的 2099 名患者，他们按计划要进行冠心血管成形术或定向性冠状动脉癍块切除术，并具有以下的临床高度危险情况：重度非顽固性绞痛并伴有静止痛感和心电图的变化，急性心肌梗塞、临床的和冠状动脉损伤形态特征并伴有高度的并发症危险。患者们接受了(a)安慰剂的浓缩药丸及渗透，(b)c7E3 Fab 的浓缩药丸和安慰剂渗透，或(c)c7E3 Fab 的浓缩药丸及其渗透。主要终点(Primary endpoint)是一种复合情况，包括发生下列情况中的任何一种：死亡、非致命性心肌梗塞、计划外的血管再造手术或重复的经皮手术、计划外的冠状动脉斯坦特植入术或对顽固性局部缺血进行主动脉内气囊泵插入术。

在主要终点处的浓缩药丸和渗透的降低效果是 35%（ 12.8 vs 8.3%, P=0.008 ），而独自使用浓缩药丸的降低效果是 11%（ 12.8 vs 11.4%, P=0.43 ）。使用浓缩药丸加

上渗透的降低效果对每一个终点成分都是一致的，另外，在大部分患者的按年龄、性别、已经患有冠状动脉血管血栓，急性冠状动脉综合症（心肌梗塞、非顽固性绞痛的）所分的亚组中也是一致的。在使用了浓缩药丸和其渗透的组中，失血现象及输血现象是增加的，而仅使用浓缩药丸时是中等程度的。这一实验揭示了用抗体片段直接抑制血小板 IIb/IIIa 受体能够通过明显降低局部缺血并发症而获得延续的临床效果。

方法

根据前述对常规经皮手术的危险性所做的研究，患者如果有发生急性血管堵塞的高度危险并且没有由于高度失血危险而造成的禁忌，那么，他们就是合适的患者。被认为是高度危险的患者是被分在下列三组之一的患者：(1)在开始进行了直接的或“抢救性”经皮手术时，发生在 12 小时内的急性心肌梗塞；(2)不论采用了何种药物治疗，在此前 24 小时发生了早期梗塞后绞痛或非顽固性绞痛并伴有至少两次静止绞痛的发作以及静止心电图的改变；(3)根据美国心脏协会/美国心脏病学院标准制定的临床和/或血管造影标准为高度危险患者(Ryan, T.J. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 12:529-45(1988))，该标准被修饰(Ellis, S.G. et al., J.Am. Coll. Cardiol., 17 (Suppl B):89B-95B(1991))。这些高度危险的临床和血管造影的标准包括在目标损伤处有两个 B 型特征或一个 C 型特征，或在 65 岁以上妇女或患糖尿病的患者中有一个 B 型特征。

该标准具体条件如下：

（I）建议采用美国食品药物和管理局(FDA)批准的装置对下列一种情况进行选择性或急性的冠状动脉血管气囊成形术或瘢块切除：

(A)非顽固性绞痛和/或非 Q 波心肌梗塞，其定义如下：

1）静止绞痛：在静止时有两次或更多次绞痛并伴有局部缺血性 ST 部分或 T 波的异常；或

2) 复发性绞痛：在住院期间对常规药物治疗无效并伴有局部缺血性 ST 部分或 T 波的异常的复发性绞痛；

3) 早期梗塞后的绞痛：在记录有心肌梗塞后的 7 天内的绞痛，伴随有静止时的绞痛以及局部缺血性 ST 部分或 T 波的异常；或由最低量的劳累引起的绞痛（2 梅脱），

其中，短暂的 ST 部分或 T 波的异常的定义如下：

a) ≥ 1mm ST 部分的压低(在 J 点后 80 毫秒)或升高(J 点后 20 毫秒处)，和/或

b) T 波的改变(通常为倒转)，其中，在所有的患者的入选时，他们的肌酸转移酶(CK)比正常水平低 2 倍。

(B)急性 Q 波心肌梗塞

1) 在心肌梗塞发生并且在此之前没有接受溶血治疗时，进行直接的手术，或

2) 对心肌梗塞进行溶血治疗失败后进行抢救性血管成形术，

其中，所接受的心肌梗塞被定义为具有如下所述的 3 种情况中的至少 2 个：

(1)延长性心绞痛（长于 30 分钟）；

(2) 总肌酸转移酶的升高超过正常水平上限的 2 倍以上(由 CK-MB 异化酶的升高来证实)；

(3)心肌梗塞的心电图(ECG)证据，定义如下：

a) ST 部分升高至少 0.1mV(在 J 点以后 0.2 秒处测定)发生在下述 3 个位置中的至少一处：

i)3 个下电极之中的 2 个(Ⅱ、Ⅲ、 aVF)；或

ii)6 个心前电极中的至少 2 个(V_1 — V_6)；或

iii)电极 I 和 aVL ；或

iv) 心前电极 V_1 — V_4 ST 部分的压低与伤后或后期心电相一致(镜子法则)；或

v) 在左侧支动脉有堵塞，在下或前电极的主要 ST 发生变化；

b) 新的显著的 Q 波≥ 0.04 秒或其深度≥相应的 R 放大波的 1/4 ，或同时具有两者。

(C)高度临床/形态学危险特征

1) 在要扩张的动脉处具有两个或更多 B 型损伤特异特征的狭窄。损伤特异性特征依据的是 ACC/AHA 标准；

2) 在要扩张的动脉处的具有一个或更多个 C 型特征的狭窄；

3) 年龄≥ 65 岁的妇女并带有至少一个 B 型特征的狭窄；

4) 糖尿病患者并在要进行扩张的动脉处具有至少一个 B 型特征的狭窄；或

5) 发生了由 CK-MB 异化酶升高而证实的心肌梗塞并在 7 天内对由梗塞所造成的损伤进行了血管成形术。

(Ⅱ) 年龄在 18 ～ 80 岁之间的男性，不具怀孕潜力的年龄在 18 ～ 80 岁之间的女性(即进行了绝育手术或绝经，定义为绝经至少一年以上)。

(Ⅲ) 在开始进行规范化的专项手术和给予所研究的试剂之前有书面文件表示同意。

其它条件适合但由于以下任何一种原因而被排出本实验的患者：

(1)具有出血素质的病史；

(2)在入选前 6 星期曾经做过重大手术；

(3)近期(入选前 6 星期内)曾有临床上为显著的胃肠道或生殖泌尿系统的出血；

(4)入选前 2 年内曾经发生过中风或有中风所遗留下来的明显的神经缺陷；

(5)左主冠状动脉发生＞ 50%的闭塞；

(6)被推断为或被证实为有脉管炎病史；

(7)在接受计划的受试药剂的渗透之前的七天内，曾经参加了其它的受试药物评价的临床研究的患者；

(8)在随机研究药剂的服用前七天内，曾经口服过抗凝聚药物的患者，除非在随机服药之前所服用的凝血酶原的份量≤对照剂量的 1.2 倍；

(9)在进行血管成形术之前或者计划在该手术中静脉注射葡聚糖；

(10)有曾经服用过鼠单克隆抗体或已知对鼠蛋白过敏的历史；或

(11)不能提供书面同意文件。

在所有的试验机构中，都从其试验审核委员会获得了他们的批准，并且从所有的患者获得了书面的同意。受试患者的筛选工作是在 1991 年 12 月～ 1992 年 11 之间完成的；共在美国的 56 所试验机构中选取了 2099 名患者。

研究规则

所有的患者都接受阿斯匹林和肝素的治疗。程序开始至少 2 小时前口服阿斯匹林剂量为 325mg，并在其后还保持每天 325mg 的剂量。肝素(猪)是以初始剂量为 10,000 ～ 12,000 单位静脉给药并接着进行每 15 分钟给予至多 3,000 单位，但是其总量不超过 20,000 单位，目的是为了使活化的凝块时间保持在“治疗”范围内，一般在程序中为 300 ～ 350 秒(Dougherty, K.G. et al., Abstracts of the 63rd Scientific Sessions, III-189 (1991) ; Rath, B. et al., Br. Heart. J., 63: 18-21 (1990); Ogilby J.D. et al., Cath. Cardiovasc. Diag., 18:206-9(1989))。然后继续将肝素以每小时 1,000 单位的速率连续输入 12 小时。根据临床的要求，还可以按静脉注射或冠状动脉内给药硝酸盐。嵌合 7E3 Fab(γ_1, κ)是以含有每毫升 0.15M 氯化钠，0.01M 磷酸钠和 0.001%聚氧乙烯山梨醇脂肪酸脂 80，pH7.2 的无菌非热原性溶液含 2 毫克单克隆 Fab 的形式使用的。在出院时患者所需要的唯一的药品是每天 325mg 阿斯匹林。

将患者随机等分到三个双盲研究组内。其中的一个组的患者以剂量为 0.25mg/kg 接受 c7E3 Fab 的浓缩药丸，然后以 10μg/分的剂量连续 12 小时渗透 c7E3 Fab 。第二组的患者接受剂量为 0.25mg/kg 的 c7E3 Fab 浓缩药丸，然后连续 12 小时渗透安慰剂溶液。第三组接受安慰剂药丸和 12 小时的安慰剂溶液连续渗透。浓缩药丸的使用是在程序开始前至少 10 分钟进行的，并且是以 5 分钟的时间完成的，所进行的渗透都是 12 小时的，除非发生了临床上的不良反应。

在病人出院以前，分别在给药后的 30 分钟、 2 小时、 12 和 24 小时对血压的血小板计数进行测定以检查血小板减少症的证据。对威胁生命的失血以及血小板减少症用

一种事先设计好的算法进行评价和处理(Sane, D.C. et al., Ann. Intern. Med., 111:1010-22(1989))。该方法的守则中没有关于红血细胞转输的具体指示；因而实际上进行的输血是按照各个地点的当地实践方式进行的。血管成形术是按照标准的规则进行的。在程序前以及程序后进行的血管造影都是在冠状动脉内给以 150 — 300μg 硝酸甘油并进行了冠状动脉舒张以后完成的。在此程序之后，血管鞘在结束了研究药剂的渗透后保持至少 6 小时。此外，将血管鞘继续保持在该位置直至肝素渗透结束后的至少 4 小时以及直至达到了可接受的被激发的部分促凝血酶原激酶时间从而保持止血。

研究终点

一个独立的临床终点委员会审核了那些可能代表着研究终点或主要负作用现象的所有情况。这个委员会在整个研究期间对具体处理方法是一无所知的，随后审核了病例记录、心电图以及所需要的相关的医疗记录。对每一事件的确定需要两个审核委员的一致意见。

该实验的主要终点是一个复合的临床终点结果，包括在随机选择后的第一个 30 天内发生了任何一种下列情况：

(1)由任何原因导致的死亡；

(2)非致命性心肌梗塞；或

(3)紧急救护：

(a)第二次血管成形术。重复经皮救护以治疗复发的急性局部缺血（气囊血管成形术和瘢块切除）。按预定计划进行的（例如，阶段性的程序）都不属于终点事件；

(b)冠状动脉分流术。紧急（非选择性）手术抢救以治疗复发的急性局部缺血；

(c)插入冠状动脉血管内斯坦特(stent)。将冠状动脉内斯坦特放置在能够使被扩张了的血管保持立即开放的位置；或

(d)插入主动脉内的对抗搏动的气囊泵。对于那些被认为不属于重复血管成形术或手术抢救的患者的复发性局部缺血放置气囊泵。

在本研究中，“开放”的定义是 TIMI 2-3 级流量并且手术医生可以用肉眼观察到小于或等于 50 %的狭窄，但心电图又没有局部缺血证据。

终点心肌梗塞的定义如下：

1．在随机取样的并在 24 小时内发生心肌梗塞的患者中，为了确诊随后发生的非致命性梗塞需要对两种酶进行测定：(a)肌酸激酶(CK)或肌酸激酶 MB 比正常值的上限至少高三倍，代表着从前一个“谷”升高至少 33 %（其定义为从前一个峰值降低了 25 %但是又保持在比正常的上限至少高 2 倍的水平上）；或(b)在前一个峰值降低了 50 %并且其“谷”值小于正常上限的两倍之后或 CK-MB 升高了至少 100 %并保持在正常上限 3 倍以上的水平上。用记录的新的长时间绞痛（长于 2 分钟）并伴随着心肌酶的再次升高的现象来确定再次梗塞的起始时间。在没有记录到绞痛的情况下，再次梗塞的起始时间就被定义为紧接着前一个新的酶的升高之后所测定到的低谷的时间。定义，仅适用于这样的患者，即在参加本研究时所发生的心肌梗塞后 24 小时之内有复发性绞痛和/或酶的低谷值开始发生的患者。在所有的病例中都使用的是 CK-MB 水平，除非无法获得这些数据，在这种情况下就使用肌酸激酶全值代替之。

2．在那些发生了急性梗塞 24 后或者最近未发生梗塞的进入本实验的患者中，要将其确诊为需要住院的心肌梗塞就要达到下列两个标准中的一个：(a)在两个或更多个临近的电极上的新的 Q 波≥ 0.04 秒，深度比相应的 R 波>1/4 ；或(b)CK-MB 值至少大于正常上限的 3 倍，并且在该水平是一个≥前一个“谷”值 50 %的增长。在本定义中，那些在进入本研究时带有急性心肌梗塞的患者发生再次梗塞的起始时间是产生新的长时间绞痛（长于 20 分钟）的时间，或

是在新的酶的升高之前测定到酶的低谷水平的时间。要想使本定义可用于实际，这两个时间从初始梗塞时算起都必须大于 24 小时。

3．出院后要想被确诊为心肌梗塞，必须达到下述两个条件中的一个：(a)在两个或更多个相邻的电极上的新的 Q 波≥ 0.04 秒，或深度比相应的 R 波＞ 1/4，或两者同时发生；或(b)CK 或 CK-MB 水平比正常的上限高 2 倍。

主要终点的另一个要点是需要进行紧急的重复手术，定义为计划外的送回到血管成形病房进行手术；主要终点并不包括按计划进行的阶段性程序。相似的，仅把用于治疗复发性局部缺血或失败了的血管成形术的紧急冠状动脉手术算作主要终点。当为了治疗在血管成形术时发生的急性血管堵塞以及为了消除发生这一情况的危险性而将斯坦特放置在冠心内时，才将这种斯坦特的放置算作主要终点。为了对没有进行重复的血管再造术的患者的复发性局部缺血而放置主动脉内气囊泵时，才将这种主动脉内气囊泵的放置认作是主要终点。

失血现象可以划分为严重、轻度及非显著性，依据的标准是血栓溶解在心肌梗塞中的研究(Thrombolysis in Myocardial Infarction Study Group criteria) (Rao, A.K. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 11:1-11(1988))。严重失血的定义是颅内失血或血红蛋白的降低大于 5 g/dl 的失血（或当无法测定血红蛋白时，依据血细胞比容降低至少 15 %）。轻度失血要么是自发的并有大量尿血或呕血，并伴有血红蛋白的降低大于 3 g/dl （或当无法测定血红蛋白时，依据血细胞比容降低至少 10 %），或当无法确定失血位点时，血红蛋白的降低大于 4 g/dl （或当无法测定血红蛋白时，依据血细胞比容降低至少 12 %）。在那些接受了输血的患者中，将其所输血的单位数累加到所观察到的血细胞比容的降低并除以 3 的数值上，以确定血细胞的总降低数量并进而确定是否有严重或轻度的失血发生(Landefield, C.S. et al., Am. J. Med., 82:703-13(1987))。

数据处理及统计学

通过公爵大学（ Duke University ）的数据采集中心用电话随机对患者进行采访。随机性是按照研究地点以及患者是否患有正在发展的急性心肌梗塞而进行的区分，基于以前的数据，选取了一组为 2100 名患者的样品组群，为的是确定主要终点的 33 %的降低（在安慰剂组群中预计为 15 %）并且其乘方为 0.8 ，$\alpha = 0.05$ 。

这些数据被研究调查员记录到病历表格上，并且在数据输入前由本研究的盲点监察人员进行监察。本研究的主持人对于随机抽样的密码以及研究结果一直为盲目的，直至所有的患者都被选择完毕，并且所有终点都被临床终点委员会进行了判断时为止。

在下表中，基线特征对于连续的可变值是以平均值和第 25 和第 75 百分分布来表示的，而对于间断的可变值是用百分数来表示的。对试验中的主要终点进行了分析，即考虑在开始实验后 30 天内第一次发生任何一种构成终点的现象的时间。如果在此 30 天的期间内未发生这些现象，在 30 天以后就对患者进行追踪调查。对每一试验的 Kaplan-Meier 存活曲线被用来图示出结果(Kaplan, E.L. et al., J. Am. Stat. Assn., 53:457-81(1958))。所有试验相互间的比较是用以治疗为目的的原则(intention-to-treat)而进行的。对于主要终点而言，进行了测定趋势（剂量反应）的对数级别的试验(log-rank test)，将仅接受了浓缩药丸的患者认作是接受了浓缩药丸和渗透组的患者的中间值(Kalbfleisch, J.D. and R.L. Prentice, The Statistical Analysis of Failure Time Data, John Willey and Sons, New York (1980))。如果对趋势的检测是显著性的，那么就在对照组和每一个 c7E3 Fab 组之间进行成对的对数级别的比较。当从 1/3 或 2/3 的患者中可获得有关数据时，就进行安全性的临时分析。在每一个临时分析中，对剂量反应的检测的显著性是用极小的α 水平来判定的，即预先设定使总体的 I 型的误差率≤ 0.05 。在最终的分析中，这种比较的显著性水平是 0.036 。在最终的分析中，也使用了相似的策略（测定趋势，然后进行成对的比较），以探查对组成终点的各个不同成分的治疗方法之间的关系，虽然这些比较主要是用来对这些现象进行解释的。在失血综合症的治疗的最终分析中也使用了这种策略，采用的是 X 平方检测。在主要分组（年龄、性别、体重、临床亚组）中的治疗效果的置信区间和差异率进行了计算并表示出来。

结果

患者组中的基线临床特征表明对这些患者进行血管成形术时发生急性并发症的危险很高，因为他们中间糖尿病患者、近期心肌梗塞患者、高龄以及带有入选标准中的损伤特征的妇女的数量很高（见表 11 ）。大多数的患者都曾经有过一种或两种血管疾病，但是左心室功能还是正常的。在表 12 中给出的是手术程序的详情。对于每一种治疗方案来说没有见到明显的差异。

表 13 给出的是总体主要终点的结果以及其组成情况。与安慰剂组相比， c7E3 Fab 显示出了分级的效果（ P=0.009 ），在仅使用了浓缩药丸的组中的综合事件的发生率被降低了 11 %（ P=0.43 ），在使用了浓缩药丸以及渗透的组中的事件的发生率被降低了 35 %（ P=0.008 ）。在表 13 中的其它的最重要的局部缺血终点也观察到相同的分级效果。因此，存留的 GPIIb/IIIa 封闭就降低了非致命性梗塞和进行紧急冠状动脉分流手术及紧急经皮血管再造手术的频率。而在仅使用浓缩药丸时所产生的短时间的封闭存在着发生上述事件的非显著性的一种倾向。在使用了浓缩药丸和渗透的组中发生了 3 例死亡，这 3 位病人都是在进行随机抽样后但又在接受药物治疗之前死亡的。尽管如此，这些死亡事件都根据以治疗为目的的原则而包括在本分析中。

由于 c7E3 Fab 可以防止非致命性局部缺血现象，因此对非致命性心肌梗塞的严重程度的预防是非常有意义的。正如在表 14 中所示， c7E3 Fab 防止了 Q 波梗塞以及带有酶的大量升高的梗塞，并且显示出了剂量反应的效果。

表 11

基线特性

	安慰剂组 (N=696)	浓缩药丸 (N=695)	浓缩药丸＋渗透 （N=708）
年龄（年）+	62 （53， 69）	61 （52， 68）	63 （53， 69）
男性（%）	73	72	71
体重（kg）	84	82	82
危险因素（%）			
糖尿病	26	23	23
高血压	55	55	54
高胆固醇	57	59	55
吸烟	65	71	68
血管疾病（%）			
外周的	9	9	9
大脑的	3	4	4
曾患过 MI （%）			
无	34	30	30
＞ 30 天	25	28	27
8-30 天	13	13	14
＜ 8 天	28	29	29
进程前			
血管成形术	25	20	22
分流术	15	14	16
冠状解剖（%）			
1 血管疾病	54	51	55
2 血管疾病	29	34	31
3 血管疾病	16	15	13

MI ＝ 心肌梗塞

＋中间值(第 25， 75 百分分布)

表 12

手术程序细节

	安慰剂 (N=696)	浓缩药丸 (N=695)	浓缩药丸＋渗透 (n=708)
程序（%）			
气囊血管成形术	90	90	90
癍块切除	5	4	5
上述两者	5	6	5
在手术室的时间（分钟）+	134, (71,394)	129 (75,401)	141 (69,513)
使用的对照（ml）+	200 (150,286)	200 (150,277)	200 (150,285)
血栓溶解剂(%)	3.2	3.7	2.3
最低的 ACT(秒)	271 (190,345)	284 (190,371)	285 (185,388)

ACT ＝活化的血凝块时间

＋中间值(第 25， 75 百分分布)

表 13

主要发生事件

	安慰剂 (N=696)	浓缩药丸 (N=695)	浓缩药丸＋渗透 (n=708)	剂量反应 P 值
主要终点*	89 （12.8%）	79(11.4%)	59(8.3%)	0.009
主要终点的组成:				
死亡	12(1.7%)	9(1.3%)	12(1.7%)†	0.96
非致命性 MI	60(8.6%)	43(6.2%)	37(5.2%)	0.013
紧急 PTCA	31(4.5%)	25(3.6%)	6(0.8%)	< 0.0001
紧急 CABG	25(3.6%)	16(2.3%)	17(2.4%)	0.177
斯坦特	4(0.6%)	12(1.7%)	4(0.6%)	0.97
气囊泵	1(0.1%)	1(0.1%)	1(0.1%)	0.99

*P ＝ 0.009 对于趋势的总体试验

P ＝ 0.43 安慰剂组与浓缩药丸组的比较

P ＝ 0.008 安慰剂组与浓缩药丸及渗透组的比较

† 3 名死亡的患者被纳入这一组，但实际上没有接受治疗

MI ＝心肌梗塞;

PTCA ＝经皮血管造桥术或瘢块切除;

CABG ＝冠状动脉分流术

表 14

c7E3 Fab 对心肌梗塞的效果

	安慰剂 (N=696)	浓缩药丸 (N=695)	浓缩药丸＋渗透 (n=708)	剂量反应 P 值
Q 波 MI(%)	2.3	0.9	0.8	0.018
大的非 Q 波 MI(%)	4.0	2.4	2.8	0.197
小的非 Q 波 MI(%)	2.3	2.9	1.6	0.342
总值（%）	8.6	6.2	5.2	0.013

MI ＝心肌梗塞
大的非 Q 波 MI 的定义是 CK-MB 的峰值或总的 CK 值＞ 5 倍的正常上限；
小的非 Q 波 MI 的定义是 CK-MB 的峰值或总的 CK 值在正常上限 3 ～ 5 倍之间。

在 3 个组中需要进行紧急重复性血管再造手术的非致命性局部缺血事件的发生时间是不同的，并且可以被准确地确定下来（见图 10 ）。在安慰剂组中大部分的事件发生在进行了引导程序后的数小时内，而在使用了浓缩药丸的组中其发生的时间是在数小时以后（约 6 ～ 12 小时），相应于对受体达到最大封闭的时间。在同时使用了浓缩药丸和渗透的组中，局部失血现象的发生时间被明显地推迟了，而且它们的绝对发生频率也被明显地降低了。

表 15 给出的是在住院期间失血并发症的轮廓情况。如同对主要终点的效果一样，也明显地存在着对失血治疗的分级效果。接受了浓缩药丸以及渗透的患者显示出在失血率及输血率上的明显的升高，而在仅接受了浓缩药丸的患者中只显示了中等程度的升高。大部分的失血现象是发生在冠状动脉分流手术时，或在腹股沟血管穿刺的位点，虽然它们的血管修复手术的分布情况是基本相等的（在安慰剂组和接受了浓缩药丸以及渗透的组中为 1 %，在仅接受了浓缩药丸的组中为 2 %）。相似地，在 6 名患者身上发生了颅内失血现象， 2 例发生在安慰剂组中， 1 例发生在仅接受了浓缩药丸的组中， 3 例发生在接受了浓缩药丸以及渗透的组中，其中的一人并没有接受药物治疗，因为他的颅内失血现象是在进行了随机抽样以后但是在进行血管成形术之前发生的。

表 15

失血并发症和血液学测量

	安慰剂 (N=696)	浓缩药丸 (N=695)	浓缩药丸＋渗透 (n=708)
严重失血（%） *	46(7%)	76(11%)	97(14%)
输血 **			
红细胞	49(7%)	92(13%)	109(15%)
血小板	18(3%)	29(4%)	39(6%)
血计数			
Nadir 血细胞比容 †	35(32,38)	34(29,38)	33(29,37)
Δ 血细胞比容 †	5.3(3.2,7.9)	6.5(4.2,9.8)	6.8(4.1,10.5)
指数 †	1.8(1.1,2.7)	2.2(1.4,3.5)	2.3(1.4,3.8)
Nadir 血小板 †	196(159,240)	194(153,236)	193(154,231)
血小板计数	24(3.5%)	29(4.2%)	42(5.9%)
＜100,000			

* P＝0.001
**P＜0.001
† 中间值(第 25， 75 百分分布)

在这些治疗结果中，次级临床症状发生的频率很低并没有很大的差别。在安慰剂组、浓缩药丸组和浓缩药丸及渗透组中的情况分别是： 30 天心衰发生率(2.3%，2.4%， 2.3%)，持续的低血压(3.0%， 3.6%， 4.1%)，心室纤维性颤动(3.0%， 2.6%，3.4%)以及临床局部缺血的发生率(21%， 17%， 18%)。

当把患者按照急性梗塞、非持续性绞痛或高度解剖性危险分组治疗以评价 c7E3 Fab 的效果时（参见图 11），在所有 3 个选定的组内都见到了 c7E3 Fab 的有益效果。相似地，其效果在按年龄或性别所分的亚组中都是相同的。虽然其效果对体重较大的

患者更为明显，但是作为体重的一个函数， c7E3 Fab 浓缩药丸及渗透的有益效果在整个患者群中都是存在的。

在仅接受了浓缩药丸的患者中以及接受了浓缩药丸和渗透的患者中，发生严重失血的危险性在较轻体重的患者中高于体重较重的患者。在接受了浓缩药丸及渗透的组、仅接受了浓缩药丸的组和安慰剂组的患者中，对于体重最轻的患者来说，发生严重失血的数字分别是 21%、 15%和 7%，而在体重最重的患者中相应地分别为 8%、 7%和 7%。在接受了浓缩药丸及渗透的组、仅接受了浓缩药丸的组和安慰剂组的患者中，对于体重最轻的患者来说，接受了输血的患者的数字分别是 24%、 20%和 11%，而在体重最重的患者中相应地分别为 11%、 7%和 4%。

讨论

这些结果确认了血小板、推测的血小衍生的调节子和血小板功能对于那些进行经皮经腔冠状动脉成形术的患者在发生急性局部缺血的情况下的重要性。在设计 EPIC 试验时，特别考虑了要选择一组具有高度发生急性血管堵塞（复发性堵塞）和其相伴随的并发症的危险的患者。对于以前的数据进行分析可以表明有些患者可以被认定为是具有高度危险的患者，依据的是他们的临床血栓病症，例如急性梗塞(Stack, R.S. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 11:1141-49 (1988)，严重的非延续性绞痛(Myler, R.K. et al., Circulation, 82 (Suppl II):II-88-II-95 (1990))，或血管造影显示了血栓(Sugrue, D.D. et al., Br.Heart J., 56:62-66 (1986); Hettleman, B.D. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 15:154A(1990))。其他的患者也是高度危险的，依据的是生理上的因素，例如血管口径窄小，渗血或血管形态畸形(Sinclair, I.N. et al., Am. J. Cardiol., 61:61G-66G (1988); Ruocco, N.A. et al., Am. J. Cardiol., 69:69-76(1992); Ellis, S.G. et al., Am. J. Cardiol., 63:30-4(1989))。在本试验中，这两类患者都有相当数量参加了本试验，使得我们能够进一步了解对每一类患者抑制血小板凝聚的内在关系。收取这些高度危险的患者被认为会使发生局部缺血现象在安慰剂组中的发生率为 15%，尽管对每一位患者都给予了阿斯匹林和大剂量的肝素，这一预测的缺血发生率几乎与现实相一致。

c7E3 Fab 使得组成事件的发生率降低了 35 %，其主要效果见于进行紧急血管成形术或紧急冠状动脉分流术的需要以及非致命性心肌梗塞都被有效地降低了。 c7E3 Fab 的浓缩药丸延迟了这些事件的起始时间，相应于对血小板凝聚的有效作用时间。然而，过了 4 ～ 6 小时以后，开始发生局部缺血现象。这一时间间隔相应于在给予鼠 c7E3 Fab 浓缩药丸之后，血小板凝聚恢复到其初始值的约 50 %时的时间间隔。

除了延迟效果外，联合使用对血小板产生长效抑制的（见实施例 4 ）浓缩药丸和渗透还能够防止急性局部缺血事件的发生。组成终点提供了对在进行血管成形术期间的局部缺血现象的这种治疗方法的总体评价。

本试验中最重要的发现之一是在不同的终点时的缓解效果的一致性。对心肌梗塞的缓解是实质性的，并且与同时的对此后需要进行紧急临床抢救的降低是一致的。就经皮冠状动脉术的评价而言，对非致命性梗塞的分类是一项重要的任务。经常发现肌酸激酶 MB 异化酶高于正常上限，在所报导的情况中有 4 %～ 21 %的患者发生了这种情况(Klein, L.W. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:621-6 (1991); Hunt, A.C. et al., Eur. Heart J., 12:690-3 (1991); Pauletto, P. et al., Am. J. Cardiol., 69:999-1000 (1987); Spadaro, J.J. et al., Cath. Cardiovasc. Diagn., 12:230-4 (1986))。当这些酶的升高并不与相应的临床症状完全一致时，就没有记载到出现长期的有害结果。因此，防止那些没有伴随着临床局部缺血事件的孤立的酶的升高就可能不具有非常深远的意义。为了保证在这一模糊区的客观性，就要有系统地采集酶和心电图数据，采用盲点终点委员会，并且要确认心肌梗塞就要求心肌特异性酶的提高至少要达到 3 倍以上。 c7E3 Fab 降低所有情况的心肌梗塞，包括那些伴随着中等程度的酶的升高、大量的酶的升高和产生 Q 波的心肌梗塞这一现象，再次确认了那些被防止的病状的临床重要性，特别是进行紧急冠状动脉再造手术的需要也被降低了。

虽然没有预期到也没有观察到对死亡率的作用，但因注意的是在浓缩药丸和渗透组内有 3 名没有接受药物的患者死亡。根据以治疗为目的的原则，将这些死亡事件在主要分析中进行处理。所有的其他的死亡的患者都实际上接受了为他们选定的治疗。由

于与血管成形术所伴随的死亡率很低，因此要确认对死亡率产生 25 %有益或有害治疗效果，就需要进行对 20,000 名以上的患者的试验。

GPIIb/IIIa 受体封闭对在高度危险的血管成形手术中的临床终点的有益效果是令人信服的，并且与近期开始进行的用同样的抗体在复发性非持续性绞痛患者的血管成形术的实验的良性结果相一致(Simoons, M.L. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 21:269A (1993))。

由于本试验是第一次的大规模的 IIb/IIIa 受体封闭试验，因此就存在着对其引起血小板减少症的危险的关注。然而 c7E3 Fab 仅产生了很小的、临床上非显著的血小板减少症的增加。特别是，对这一试验结果的分析揭示出在接受了浓缩药丸及渗透的治疗组内有更多的患者（ 5.2%）发生了血小板减少现象（血小板计数＜ 100,000/μL ），高于浓缩药丸治疗组（ 3.6%）和安慰剂组（ 3.4%）。因此，与安慰剂组相比，在浓缩药丸及渗透处理组中的血小板减少现象的发生（血小板计数＜ 100,000/μL ）被提高了（ P ＝ 0.062 ）。严重的血小板减少症（血小板计数＜ 50,000/μL ）发生在浓缩药丸及渗透处理组中的 11 名患者中（ 1.6%），在安慰剂组中有 5 名（ 0.7%）患者发生了这一现象。在浓缩药丸及渗透组和安慰剂组中各仅有 4 名患者（＜ 1 %）同时发生血小板减少症和严重的、危及生命的或致死性负作用。所有的血小板减少症的情况都是短暂的，并且一般都发生在最初的几天内。

在治疗的患者中，失血并发症和输血都有明显的增加。这一增加主要是在股穿刺位点的失血的结果，并且在这 3 组中都没有导致 Nadir 血细胞比容或危及生命的并发症的明显的变化。无论是否将进行手术的患者包括或不包括在本分析中，这些趋势都保持不变。在本盲点研究中，由于对所采用的治疗方案的不确定性，就可能导致在某些试验地区出于对止血的关心而降低了进行输血的标准。根据我们以往的经验，已经得到证实的是经过重新修订的用于处理失血和对接受了溶血剂的患者进行输血的守则，可以有效地减少使用血制品(Wall, T.C. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 21:597-603 (1993))。

作为体重函数的治疗效果与失血危险之间的相互作用实际上比预期的更为复杂。虽然在安慰剂组患者中主要症状的发生率和严重失血的危险性依据体重的变化是很小的，但是在 c7E3 Fab 浓缩药丸组和浓缩药丸及渗透组的患者中非常清楚地存在着随体重的降低而发生主要结果症状的增高和严重失血增高的趋势。

在进行经皮血管扩张术之前、之中或之后对患者临床采用本封闭 GPIIb/IIIa 受体的方法的判定要依据避免局部缺血现象对给予的血产品的相对平衡值来决定。在参加本试验的高度危险的患者中，这一平衡表现出对患者是有益的。急性心肌梗塞和紧急重复血管扩张术的预后影响是严重的，幸运的是，进行输血的要求继续下降(Donahue, J.G. et al., N. Engl. J. Med., 327:369-73 (1992); Dodd, R.Y. N. Engl. J. Med., 327:419-21 (1992); Nelson, K.E. et al., Ann. Intern. Med., 117:554-9 (1992))。努力采用降低不必要的失血和输血以及更有效地使用抗血栓剂的实际计算方法，包括抗血栓剂和抗血小板剂，应该可以进一步提高在本试验中所观察到的临床效果。在实践中，对那些带器械的患者给予有效的、非肠道抗血栓剂时，必须注重依其体重来调节抗血栓药剂的剂量（例如，肝素的剂量在此并不依据体重而进行调节）。在所有参加本试验的地区内采用更加详细的确定降低失血的方法的守则和评价方法，可以获取更多的关于失血并发症发生的信息。

在患者群中，广泛的有效治疗的一致性是血栓形成在很多患者中为更重要因素的强有力的证据，尽管在某些病例中突然阻塞可能是血栓性的或生理性的。由浓缩药丸剂所产生的对发病的延迟以及由浓缩药丸和渗透共同产生的对发病的防止，都意味着在大多数情况下受到损害的动脉的表面都在本程序之后的 18 ～ 24 小时丧失了其血栓形成功能。实际治疗方案中应该考虑到在有高度危险发生急性血管堵塞的患者中对持续的抗血栓效果的需求。

总而言之，本试验表明了在进行高度危险的经皮血管扩张手术的患者中提供有效的、持续的对 GPIIb/IIIa 受体的封闭可以降低和/或防止复发性闭塞及突发性堵塞。虽然这一有益效果的获取是以增加失血的危险性为代价的，但是基于临床的和本程序前所做的血管造影的预测，对于那些患有急性局部缺血并发症危险的病人采取这种治

疗方法所得到的总体临床效果则是对患者有益的。本试验首次为抑制细胞组分的功能提供了真实有效、意义深远的治疗方法，并为将来在生物技术上选择其它的细胞组分（ integrin ）目标以及对这一特异性 GPIIb/IIIa 采取非抗体的或多肽方法铺设了宽广的道路。

实施例 7

冠状动脉手术后早期使用抗 GPIIIb/IIIa 嵌合抗体片段降低临床复发性狭窄

在进行了气囊血管成形术或经皮冠状动脉手术后发生的重复狭窄是极为常见的，在术后的 6 个月内，有 25 %的病例导致了绞痛症状的重复发生以及需要重复进行血管扩张术，其总的花费在美国每年高于 20 亿美元(Popma, J.J. et al., Circulation, 84: 1426-1436 (1991); Topol, E.J. et al., Circulation, 87:1489-1497 (1993); Herrman, J.-P.R. et al., Drugs, 46:249-262 (1993))。重复狭窄的主要生物学起因是血管壁的损伤，由扩张的气囊或手术器械在手术位点造成，以及伴随着的血小板凝聚的形成和内侧平滑肌细胞从它们的休止与收缩状态到可移动、繁殖和分泌功能状态的表形上的改变(Forrester, J.S. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:758-769 (1991); Ip, J.H. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:77B-88B (1991); Casscells, W., Circulation, 86:723-729 (1993))。尽管已经有不同的药物制剂在调节血管壁损伤后的特征性肌内膜生长的试验中为成功性的，而且小型研究也建议它们可带来在血管造影上的有益效果，但是迄今为止还没有一个大规模的临床试验在患者中证实了药剂的有效性，而且也没有已知的能够降低这些病状的药物治疗(Popma, J.J. et al., Circulation, 84: 1426-1436 (1991); Herrman, J.-P.R. et al., Drugs, 46:1489-1497 (1993); Herrman, J.-P.R. et al., Drugs, 46:249-262 (1993); Mercator Study Group, Circulation, 86: 100-110 (1992))。

冠状动脉血管成形术是一种常规手术并辅助于口服阿斯匹林和静脉内注射肝素。然而，这种抗血栓方法只能对血小板的凝聚产生很弱的抑制。很多不同的拮抗剂包括凝血酶、胶原蛋白和二磷酸腺苷都可以激发血小板，甚至在有阿斯匹林存在时也是如

此。对血小板的分子生物学的研究已经阐明了 GPIIb/IIIa 组分是负责血小板凝聚的受体(Plow, E.F. et al., Prog. Hemostas. Thromb., 296:320-331 (1988); Coller, B.S. J. Clin. Invest., 76:101-108, (1985))。嵌合 7E3 抗体的 Fab 片段，选择性地与血小板的 IIb/IIIa 组分结合。当最初的研究确认了嵌合单克隆抗体 Fab 片段的初步安全性和有效性后，就在 2,099 名患者中进行了多中心、双盲、安慰剂控制的试验（见实施例 6 ）。除了在急性状态下的严重局部缺血现象得到降低的主要有效终点，即代表着对急性堵塞的抑制（见实施例 6 ）之外，还确定了 c7E3 能够降低临床重复狭窄的发生，正如在其后 6 个月的追踪期内的局部缺血或进行重复血管扩张的需要的结果而证实的那样。

方法

本研究的人群和守则的详情都如实施例 6 中所述。简而言之，合适的病人是指曾经进行过冠状动脉成形或定向性瘤块切除并正在发生或近斯内发生过心肌梗塞、非顽固性绞痛或高度危险的血管造影损伤形态的患者，正如美国心脏学会/和美国心内科学院的标准所定义的那样(ACC/AHA Task Force Report, J. Am. Coll. Cardiol., 12:529-545 (1988))。排除的原则是失血性素质、年龄≥ 80 岁、近两年内曾经发生过中风或在过去的 6 周内曾进行过重大手术。该守则在所有 56 个参加的地点都得到了该处的学术审查委员会的批准，并且或得了所有的患者的同意。

患者口服阿斯匹林（ 325mg/天），第一次服药是在程序开始的至少 2 小时前进行。静脉注射肝素是在程序中进行的，为的是获得至少 300 秒的活化凝血块的时间。除了阿斯匹林和肝素以外，患者随机地被给予下述 3 种处理中的一种：(1)安慰剂浓缩药丸和 12 小时的安慰剂渗透；(2)0.25mg/kg 的活性 c7E3 （ Centocor, Malvern, PA ）的浓缩药丸和 12 小时的安慰剂渗透；或(3)同样剂量的活性 c7E3 浓缩药丸并随后立即进行 12 小时的 10μg/分的 c7E3 渗透。浓缩药丸的服用是在冠状动脉手术程序开始前的 10 分钟进行的。

主要终点是 30 天内的任何一种原因造成的死亡，其原因有心肌梗塞、对急性局部缺血进行的冠状动脉分流术、对急性局部缺血进行重复的经皮冠状动脉手术，为了治疗局部缺血而进行主动脉内的气囊泵放置和腔内斯坦特。所有这些现象都由一个独立的临床终点委员会来进行审核，该委员会在整个研究期间内是盲目的，而且对每一症状进行分类时至少得有 2 个审查委员的一致意见。

在随后的 6 个月的追踪期内继续保持双盲。除了随后的死亡或致命性心肌梗塞之外对患者们进行追踪，以确定进行包括经皮冠状动脉手术或冠状动脉分流术或进行这两种手术的重复性血管扩张的需要。与急性阶段终点不同，放入斯坦特或在主动脉内置入气囊泵都不被包括在这一结果内，因为本方法所注重的是进行血管扩张的需要，而不是作为突然局部缺血的替代品。出院后的心肌梗塞的确诊的条件是两个或更多个相邻的电极上有新的显著的 Q 波≥ 0.04 秒或比相应的 R 放大波的深度≥ 1/4 的深度；或者肌酸激酶或肌酸激酶心肌带超过正常上限的 2 倍以上。收集血管扩张的数据以及最初的目标血管是否经过了重复的手术或经皮血管扩张的数据。追踪的完成率是 97.2%。

为了评价 6 个月的调查结果是否与紧急阶段的结果不同，在所进行的分析中就包括了从开始到 6 个月期间的所有发病情况，接受了成功的早期手术的患者的 30 天终点以后的发病情况（其定义为根据临床医生的检测证实获得了最后的狭窄小于 50 %并且没有局部失血并发症），以及接受了成功的早期手术的患者的 48 小时以后的发病情况。对于 30 天终点的选择依据的是以前的很多心血管手术试验的病例。以 48 小时为一阶段点，是因为已知定义限定的几乎所有的冠状动脉手术后的急性堵塞病状都是在这一个期间内发生的(Detre, K.M. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 13:230A (1989); Lincoff, A.M. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 19:926-938 (1992); de Feyter, P.J. et al., Circulation, 83:927-936 (1991))。

通过公爵大学（ Duke University ）的数据采集中心用电话随机对患者进行采访。随机性是按照研究地点以及患者是否患有急性心肌梗塞而进行的区分。这些数据被研究调查员记录到 6 个月的病历表格上，并且在数据输入前由本研究的盲点监察人员对表格的质量进行监察。本研究的主持人对于随机抽样的密码以及追踪调查结果一

直为盲目的，直至所有的追踪调查完毕，并且所有的病例都被临床终点委员会进行了判断，从而完成了数据库的建立。

统计学分析

所有的治疗之间的比较都是按以治疗为目的的原则进行的。对发病率的评价采用了Kaplan-Meier 方法(Kaplan, E.L. and P. Meier, J. Am. Stat. Assn., 53:457-481 (1958))，并且以存活曲线用图示的方法表示其结果。采用常规化的对数级别统计方法(log-rank statistic)对安慰组、浓缩药丸组、浓缩药丸及渗透组的发病率进行了剂量反应的检测（结果分别为 0， 1 和 2 ）。对安慰剂组与采用了 c7E3 的各组之间的比较也采用了对数级别统计的方法。部分危害模型(Proporstional hazards models)(Cox)适用于判定起始病征与结果之间是否存在着因果关系的检验。这些都是结合了治疗差异模式在所有的治疗组中进行的，并且对各治疗组分别进行了检验以确定他们之间的差异。此外，部分危害回归模式(Proporstional hazards regression models)(Cox)适用于所有的在 48 小时追踪后的组成终点以判定那些与后来发生的病状或治疗效果有关的因子。本分析中的这些因子包括治疗方案，进行过血管扩张的单一损伤或多重损伤，治疗期间的长短，在开始时的心肌梗塞或非顽固性绞痛或其它的高度危险的入选病状，性别，年龄≥ 65 岁或＜ 65 岁，体重以及糖尿病。

结果

病人的选取从 1991 年 12 月 1 日开始直到 1992 年 11 月 18 日截止，共选择了 2099 名患者。在整个研究中的各种特征都在以上给出了（见实施例 6 ，表 10 ）。表 16 给出的是那些曾经进行了成功的先期血管成形术或癍块切除术并使他们能够入选为以后发生临床重复狭窄的患者的初始病症。在那些曾经进行了成功的先期手术的患者的起始病症中并没有由于治疗方案而造成的显著差异。

表 16

进行过成功的先期手术的患者的人口学特征

	安慰剂 (N = 609)	浓缩药丸 (N = 605)	浓缩药丸及渗透 (N = 620)
年龄（年）	60.0 ± 10.3	59.7 ± 10.4	60.2 ± 10.6
性别（%）	430(71.7%)	434(71.7%)	445(71.8%)
体重（公斤）	84.9 ± 16.0	83.5 ± 16.5	83.3 ± 15.7
危险因素（%）			
糖尿病	155(25.8%)	146(24.1%)	139(22.4%)
高血压	321(53.7%)	329(54.8%)	314(50.8%)
高胆固醇	316(52.7%)	337(55.7%)	324(52.3%)
吸烟	377(64.7%)	428(71.8%)	423(69.5%)
血管疾病			
外周的	47(7.9%)	52(8.7%)	52(8.5%)
大脑的	21(3.5%)	19(3.1%)	27(4.4%)
曾经患过 MI(%)			
无	275(45.8%)	239(39.5%)	253(40.8%)
＞ 30 天	109(18.2%)	126(20.8%)	128(20.6%)
8 － 30 天	45(7.5%)	55(9.1%)	57(9.2%)
＜ 8 天	171(28.5%)	185(30.6%)	182(29.4%)
进程前			
血管成形术	145(24.3%)	121(20.0%)	139(22.6%)
分流术	88(14.7%)	85(14.0%)	95(15.3%)
冠状解剖（%）			
1 血管疾病	337(56.2%)	324(53.6%)	354(57.1%)
2 血管疾病	170(28.3%)	198(32.7%)	191(30.8%)
3 血管疾病	93(15.0%)	83(13.7%)	75(12.1%)
手术种类			
气囊	540(90.0%)	549(90.7%)	561(90.5%)
瘢块切除(atheretomy)	37(6.2%)	27(4.5%)	34(5.5%)
上述两者	23(3.8%)	29(4.8%)	25(4.0%)
目标血管			
LAD	241(40.2%)	229(37.9%)	262(42.3%)
LCX	144(24.0%)	159(26.3%)	165(26.6%)
RCA	234(39.0%)	253(41.8%)	219(35.3%)
Left Main	4(0.7%)	1(0.2%)	3(0.5%)
移植	35(5.8%)	35(5.8%)	43(6.9%)

接受了 c7E3 浓缩药丸的患者以及接受了 c7E3 浓缩药丸及渗透的患者们都显示了明显的失血并发症的升高，主要发生在第一个 48 小时内，并且其输血率几乎增加了一倍（安慰剂组 7 %，浓缩药丸且 13 %，浓缩药丸及渗透组 15 %， P ＜ 0.001 ）。 12 小时的连续渗透在下述患者中没有进行完全，安慰剂组中 48 名患者（ 7.0%），浓缩药丸组 85 名患者（ 12.5%），浓缩药丸及渗透组患者 107 名（ 15.8%）。

在接受了 c7E3 的患者中没有见到血小板减少症或过敏反应的升高。人抗嵌合抗体（ HACA ）的阳性反应在浓缩药丸组中为 5.2%，在浓缩药丸及渗透组中为 6.5%。大多数产生阳性 HACA 反应的患者都是低效价的反应。浓缩药丸组中产生阳性 HACA 反应的全部 32 名患者的效价都≤ 1:1600 。浓缩药丸及渗透组中产生阳性 HACA 反应的全体 40 名患者中的 34 名的效价都≤ 1:1600 。在浓缩药丸及渗透组中有 6 名患者的 HACA 效价在 1:6400 与 1:51200 的范围内，而在浓缩药丸组中没有发生这种现象。

到 30 天时，与安慰剂组（ 12.8%， P ＝ 0.009 ）相比，接受了 c7E3 浓缩药丸及渗透的患者（ 8.3%）中的严重局部缺血现象（死亡，心肌梗塞，急性血管扩张术）被降低了 35%（见实施 6 ，表 13 ）。表 17 给出的是 6 个月的数据，其中有死亡、心肌梗塞、以及需要进行冠状动脉分流术或重复性冠状动脉手术的结果，并且伴随针对下列各种情况的血管扩张手术：(a)所有入选的患者，(b)入选后的 48 小时内没有局部缺血并发现象但又进行了成功的治疗的患者，和(c)那些进行了成功的先期治疗并在第一个 30 天内没有发生病症的患者。到 6 个月时局部缺血现象和血管扩张手术被降低了 23 %（ 27%对 35%， P ＝ 0.001 ；见表 17 ，所有入选的患者，死亡、 MI 、 CABG 、 PTCA ）。造成这种有益的长期效果的主要原因是在那些进行了先期成功的手术的患者中降低了对再次进行分流手术或血管成形术的需要，正如重复进行的目标血管扩张在 c7E3 浓缩药丸及渗透组中（ 16.4%）与安慰剂组中（ 22.3%）相比所显示的被降低而证实（ P ＝ 0.007 ；见表 17 ）。在仅采用了浓缩药丸的组的结果，根据本实验的标准而言并没有产生比安慰剂组强很多的结果，并且是非显著性的。

在另外的一个分析中，对所有的在 30 天内没有经历主要病状的患者的 6 个月的数据进行了研究。这一分析的结果列于表 18 。这些数据指出在那些接受了 c7E3 浓缩药

丸及渗透的患者中，需要进行重复性血管扩张术的患者降低了 21%。

表 17

6 个月的结果

	安慰剂 (N＝696)	浓缩药丸 (N＝695)	浓缩药丸及渗透 (N＝708)	P 值
所有受试患者				
死亡(%)	3.4	2.6	3.0	0.827
MI (%)	10.5	8.0	6.9	0.016
CABG(%)	11.0	9.7	9.4	0.339
PTCA(%)	20.8	19.8	14.3	0.001
复合死亡, MI, CABG, PTCA(%)	35.0	32.4	26.9	0.001
任何血管扩张术 (CABG/PTCA)(%)	29.4	27.2	23.1	0.008
目标血管重复扩张(%)	22.3	20.8	16.4	0.007
所有进行了成功的手术的患者在 48 小时				
	(N＝606)	(N＝618)	(N＝639)	
死亡(%)	2.7	2.3	3.0	0.664
MI (%)	2.6	2.4	2.5	0.860
CABG(%)	7.6	7.4	7.0	0.701
PTCA(%)	16.4	17.2	11.5	0.010
复合死亡, MI, CABG, PTCA(%)	25.3	24.1	19.1	0.007
任何血管扩张术 (CABG/PTCA)(%) (所有患者)	23.0 (N=636)	22.5 (N=655)	18.0 (N=666)	0.025
目标血管重复扩张(%)	18.9%	18.4%	15.6%	0.134
所有进行了成功的手术的患者在 30 天				
	(N＝549)	(N＝576)	(N＝598)	
死亡(%)	1.7	1.3	1.5	0.789
MI (%)	2.0	1.9	1.7	0.716
CABG(%)	5.6	5.7	4.7	0.438
PTCA(%)	12.5	14.4	10.0	0.180
复合死亡, MI, CABG, PTCA(%)	19.2	20.1	15.2	0.072
任何血管扩张术 (CABG/PTCA)(%)	18.4	18.3	14.6	0.077
目标血管重复扩张(%)	16.8	16.4	14.3	0.265

表 18

在所有 30 天时没有发生病状的患者的 6 个月时的结果

	安慰剂 (N＝601)	浓缩药丸 (N＝611)	浓缩药丸及渗透 (N＝643	P 值
死亡(%)	1.8	1.3	1.0	0.38
MI (%)	2.4	2.5	2.2	0.85
CABG(%)	5.9	5.5	4.4	0.24
PTCA(%)	13.8	14.8	10.7	0.12
CABG/PTCA(%)	18.4	18.3	14.6	0.077
复合死亡: MI, CABG, PTCA(%)	19.5	19.6	15.4	0.059
从基线时的复合情况 (包括 0-30 天) (%)	34.8	32.2	26.9	0.001

所有受试患者的所有病状的数据（死亡，非致命性梗塞或需要进行冠状动脉扩张术）还在图 12 中给出。那些进行了成功的手术并且在 30 天内没有发生病症的患者的数据还在图 13 中给出。

对急性阶段终点而言，81 %的病状是在前 48 小时发生的。这一情况在所有各受试组都是相似的（安慰剂组 82.0%, 浓缩药丸组 79.7%，浓缩药丸及渗透组是 81.4%）。参考在进行了成功的先期手术的患者的第一个 48 小时内发生病状的情况，就可以确定在第 1 个 30 天内所要进行的目标血管扩张术。正如在图 14 中所示，对于 c7E3 浓缩药丸组和 c7E3 浓缩药丸及渗透组之间的亚急性局部缺血病状直到 30 天以后才有明显的差异。

除了对包括没有进行先期治疗的血管的复合死亡，心肌梗塞和血管扩张术进行分析外，对目标血管扩张术进行单项分析也是很有意义的。对所有患者在 6 个月时而言，目标血管扩张在浓缩药丸及渗透组中比其他受试各组明显地降低了 26%（见图 15 ）。值得注意的是，按照本试验的条件进行追踪调查的结果显示出仅采用浓缩药丸的治疗并没有对目标血管扩张造成任何影响。

在开始时对亚组间的分析以区别具有急性冠状综合症（非顽固性绞痛，最近的或急性的心肌梗塞）的患者与那些患有顽固性绞痛但没有高度危险的血管形态的患者（表19）。这一研究表明在这两个亚组中对复合事件都有显著的降低效果，但是，对需要重复进行冠状动脉手术的降低只在患有顽固绞痛的患者中为显著的（表 19）。这一发现在进行了成功的手术的患者中的开始及 48 小时的结果之间是一致的。

表 19

对急性冠状动脉综合症与顽固性绞痛患者的亚组的分析

从开始至 6 个月的事件

	安慰剂	浓缩药丸	浓缩药丸及渗透	P 值
急性冠状动脉综合症				
N	288	306	299	
复合事件	33.1%	28.8%	25.5%	0.039
重复 PTCA	20.2%	16.9%	15.4%	0.129
顽固性绞痛				
N	408	389	409	
复合事件	36.3%	35.3%	28.0%	0.012
重复 PTCA	21.3%	22.1%	13.5%	0.004

从 48 小时至 6 个月时的事件

急性冠状动脉综合症				
N	252	277	271	
复合事件	23.5%	21.4%	17.8%	0.094
重复 PTCA	14.8%	15.2%	11.9%	0.325
顽固性绞痛				
N	354	341	368	
复合事件	26.6%	26.4%	20.0%	0.034
重复 PTCA	17.5%	18.7%	11.1%	0.013

讨论

从本大规模、多中心、随机试验所获得的结果证实了在接受了浓缩药丸及渗透以封闭血小板 IIb/IIIa 部分的进行冠状动脉治疗的患者中使复发性狭窄的临床发生得到了降低。其有益效果的程度在 6 个月时为大约 23%，包括所有的局部缺血事件，例如死亡、非致命性心肌梗塞和重复血管扩张术，而在目标血管扩张术上的降低为 26%。这些使用 c7E3 浓缩药丸及 12 小时渗透所获得的有益效果使急性堵塞和急性阶段负反应结果被降低到不需要进行后来的冠状动脉血管扩张术的程度。

在本试验中所用的单克隆 Fab 片段对血小板 IIb/IIIa 表面部位有非常有效的结合性并且很少被解脱下来。前述的对接受了 c7E3 并进行血管成形术的患者的研究表明在终止抗体的渗透以后还持续存在着对 IIb/IIIa 结合位点的至少 36 ～ 48 小时的占据，以及对血小板凝聚的至少 72 小时的抑制（见实施例 4；又见，Ellis, S.G. et al., Cor. Art. Dis., 4:1675-175 (1993); Tcheng, J.E. et al., Circulation, 88:(1993)）。虽然这些效果都随时间逐步消失并回到基线值，但是 c7E3 对血小板凝聚的抑制效果的期间是非常有意义的，因为在本试验的条件和标准下，浓缩药丸及安慰剂渗透的治疗中没有观察到在急性阶段或 6 个月的结果中产生明显的临床效应。这一观察结果指明通过使用抗 GPIIb/IIIa 抗体来降低急性局部缺血或临床复发性狭窄可能需要更长时间的接受这些制剂（正如采用浓缩药丸及渗透药物所示），而且更长期地对 GPIIb/IIIa 的抑制可以产生进一步改进的治疗效果。

还值得注意的是，c7E3 还被报导可与玻连蛋白受体相结合(Hynes, R.O., Cell, 69:11-25(1992))，其原因可能是该受体含有 GPIIb/IIIa 的β_3成分。这一玻连蛋白受体(vitronectin)可能参与对狭窄或复发性狭窄的调节，将抗 GPIIb/IIIa 的物质与该受体结合可能有助于所观察到的效果。其他 GPIIb/IIIa 受体的抑制物具有对目标及同源成分的不同程度的特异性(Sutton, J.et al., Clinical Research AFCR, 41:118A (1993))。进行比较试验可以将这些分子相互作用分解到与之相应的临床效果。

在本试验中，没有进行系统性的6个月的重复血管造影检验以定量地确定各受试组中的效果。虽然重复的血管造影在很多的重复狭窄试验中都被进行了(Forrester, J.S. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:758-769 (1991); Ip, J.H. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:77B-88B (1991); Casscells, W., Circulation ,86:723-729, (1993); Topol, E.J. et al.,N. Engl. J. Med., 329:228-233 (1993); Adelman, A.G. et al., N. Engl. J. Med., 329:228-233 (1993); Serruys, P.W. et al.,Circulation, 84: 1568-1580 (1991))，但是它有一个主要的缺陷，即在无症状的患者中对目标血管狭窄的诊治经常会导致在实际上不需要进行的重复的治疗。与之相反，本试验提供了对大量患者的临床实际治疗的一种模拟。复发狭窄试验的真正目的是显示对需要重复血管扩张术的显著降低，因为最近进行的一些复发狭窄试验记录中的血管造影效果的本身并不是与临床完全相关的或单项适合的。进而言之，由于死亡及心肌梗塞在接受了经皮冠状动脉治疗的患者中并不是很常见的，因此由有效的药物治疗调节所得到的最重要的效果应该是重复的目标血管扩张术，正如在本试验所见到那样。因为在本试验中的患者们接受的治疗除了在使用的药物、浓缩丸和渗透不一样以外，在其他的方面包括在追踪调查完成之前始终保持双盲性方面都是一样的，因此可以合理地得出的结论是对复发性狭窄的降低产生了所观察到的临床的有益的效果。

这就显示了本第一次的大型随机试验表现出在是否需要进行随后的血管扩张术方面的有益的临床降低效果，并且可被解释为在临床上更少地发生了复发性狭窄。这些结果是通过 IIb/IIIa 封闭剂的浓缩药丸及渗透而达到的，并且导致受伤血管壁的真正的愈合。尽管 c7E3 的渗透只进行了 12 小时，但这种制剂的抗血小板效果可以延续数天，而且在急性阶段没有发现重复发生局部缺血事件的证据。更重要的是在 6 个月时降低目标血管扩张术的独立的有益效果表明紧急 c7E3 药物治疗的持续效应，并且可以被认作是血管壁愈合的临床证据。

用血小板 IIb/IIIa 封闭而使临床复发狭窄被降低这一现象进一步地说明了血小板凝血在复发性狭窄中的作用，而这种血小板凝聚已经被认为是在血管成形术后或内皮受伤的新内膜损伤发生的关键(Schwartz, R.S. et al., J. Am. Coll. Cardiol.,

20:1284-1293 (1992); Toppl, E.J. Mayo Clin. Proc., 68:88-90 (1993); Willerson, J.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10624-10628 (1991))。虽然内侧平滑肌细胞的增殖也可能在复发性狭窄中扮演非常重要的角色(Forrester, J.S. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:758-769 (1991); Ip, J.H. et al., J. Am. Coll. Cardiol., 17:77B-88B (1991); Casscells, W., Circulation ,86:723-729, (1993)),但本试验的结果表明，有效的抗血小板及抗凝血途径可能是对这一重要的临床现象为非常有益的。本试验支持了这样一种观点，即现行的使用阿斯匹林作为唯一的抗血小板剂在冠状动脉治疗中(Schwartz, L. et al., N. Engl. J. Med., 318:1714-1719(1988))是非常不够的，无法完成血管损伤的血小板反应的拮抗。

实施例 8

随机性双盲安慰剂对照试验的其它发现

管鞘尺寸和失血并发症

用 EPIC 试验（见实施例 6 和 7 ）对失血并发症进行分析，确定在进行 PTCA/DCA 时管鞘尺寸是否与失血并发症相关。管鞘尺寸及导向导管的尺寸是由医生临床决定的。对主要的失血现象，如腹股沟失血、输血、血管修补、 nadir Hct 作了预测的分析。

尽管对已知失血预测因素进行了调整，包括插入导管期间使用的肝素以及治疗方案（ P = 0.0004 ），管鞘尺寸仍旧可以预测腹股沟的失血。较多的血管的修复伴随着较大的管鞘尺寸这一倾向并非显著性的（ P = 0.0004 ）。严重失血（ 10.5%）、输血（ 11.8%）和 nadir Hct （ 34%）并不依据管鞘的尺寸而变化。接受了 c7E3 Fab 的患者发生比不接受 c7E3 Fab 的患者有更多的腹股沟失血（ 55% vs. 30%, P<0.0001 ）。

	6F-7.5F n=375	8F-8.5F n=1416	9F-11F n=291
腹股沟失血	140(38%)	674(48%)	147(51%)
血管修复	5(1.3%)	17(1.2%)	7(2.4%)

这些结果表明大尺寸的管鞘伴随着更多的腹股沟失血但并不影响 PTCA/DCA 的严重失血并发症。 c7E3 与腹股沟的失血增加有关，但是可以通过采用较小尺寸的管鞘和导向导管而使之最小化。

冠状动脉治疗中抑制血小板 GPIIb/IIIa 受体后的局部缺血现象与失血现象的关系

EPIC （评价 c7E3 在防止局部缺血并发症中的作用）试验（见实施例 6 和 7 ）表明用 c7E3 Fab 这种血小板受体 GPIIb/IIIa 的有效拮抗剂的治疗，可以防止在进行高度危险的冠状动脉成形术（ PTCA ）时的局部缺血并发症，但是对于其失血现象则需要将输血从安慰剂组的 7 %升高到 c7E3 Fab 组的 14%。为了对其进行更深一步的调查，对失血指征（ nadir 血细胞比容，失血指数，血细胞比容的变化，所输入的血红细胞的单位数）与本试验的主要终点（死亡，心肌梗塞，冠状动脉分流术（ CABG ），或对急性局部缺血进行的 PTCA 或针对治疗失败而进行的冠状动脉斯坦特插入）之间的关系进行了调查。在失血与主要终点之间发现了很强的相关关系（对于所有失血指征 P = 0.0001 ）。这一相关关系存在于下述各项治疗中：安慰剂， c7E3 Fab 浓缩药丸，c7E3 Fab 浓缩药丸及其渗透。因此，具有显著失血的患者就更容易发生局部缺血并发症。这一很强的相互关系可能是由于伴随主要终点事件（如 CABG ）的失血的增高而造成的。另外，失血以及所伴随的低血压也可能是造成术后的局部缺血并发症的主要因素之一。支持这一点的是，在进行了成功的 PTCA 后的患有低血压（除了在主要结果事件以后的低血压）的患者是非常明显的更容易发生主要结果事件，并且更容易发生严重失血及主要结果事件。

	低血压	没有低血压	P 值
数	239	1597	-
主要终点（%）	46(16.1)	103(6.5)	<.001
终点＋严重失血(%)	18(39.9)	10(9.7)	<.001

其结论是，失血似乎是可以引起在某些患者身上的局部缺血并发症，而降低失血的方法（例如改变肝素的剂量）可以进一步地在冠状动脉治疗中提高 GPIIb/IIIa 抑制的抗局部缺血的效率。

在高度危险血管成形术中积极性血小板抑制的经济益处及害处

在 2,100 名患者的 EPIC 随机试验中（见实施例 6 和 7 ）采用高剂量的 c7E3 Fab 的积极性血小板抑制使得高度危险的冠状动脉血管成形术（ PTCA ）中发生的死亡、复发性梗塞和复发性局部缺血被降低了 35 %，但是， PTCA 后的严重失血增加了一倍。为了评价这种临床综合效应的经济学结果，进行了更详细的经济学方面的展望及研究。对每一位参加试验的患者收集了他们的参加试验后 6 个月的住院花费（不包括服务费）和所用资源的数据。对于没有复杂的住院过程的患者的平均基本住院花费为 9300 美元。严重并发症对基本住院花费的影响是按照多变量线性回归模型(multivariable linear regression model)进行分析的：

平均住院花费等于＝ 9065 美元＋ 5923 美元（紧急 PTCA ）＋ 28,219 美元(紧急 CABG)＋ 3645 美元[(复发)梗塞]＋ 3462 美元（严重失血）

这一模型显示将紧急 PTCA 从 4.5%减少到 0.8%，紧急 CABG 从 3.6%减少到 2.4%以及将（复发）梗塞从 8.6%减少到 5.2%就使得 c7E3 片段的治疗方法比安慰剂治疗方法对每个患者平均降低了费用 682 美元。然而，由于严重失血被增加了一倍，即从 7%至 14%，那么这种方法就丧失了 242 美元的潜在的可能节约的优势，其结果是对每位患者来说实际上的花费的净节省值为 440 美元。实际上对于高剂量 c7E3 Fab （ X ＝

$10,970±7,284 ）与安慰剂（ X ＝$11,376±12,555 ）之间的平均费用的差距为 406 美元，与模型的预测值非常接近。

因此，通过对高度危险的 PTCA 的局部缺血并发症的明显降低，使用嵌合抗 GPIIb/IIIa 片段的对血小板的积极性抑制就提供了改善的医疗效果和净花销的节省。在保证治疗的有益效果的同时，采用能够使服用 c7E3 时的严重失血率被降低的方法还可以使预测的净花费的节省数升高到每位患者为 700 美元。

在冠状动脉治疗中用血小板 GPIIb/IIIa 拮抗剂可使活化的凝血时间得到提高

活化的凝血时间（ ACT ）被用于经皮经腔冠状动脉血管成形术（ PTCA ）以监测对凝血酶抑制的程度和在使凝血现象被最小化的尝试中的抗凝聚作用。在引入有效的血小板抑制剂例如嵌合单克隆 c7E3 Fab 抗体后，对在 PCTA 中的调节 ACT 的方法的实用性还没有进行检验。直至目前为止， c7E3 对 ACT 的影响还是未知的，并且还没有被推测出来。血小板 GPIIb/IIIa 的拮抗机制的对 ACT 方法的可能的影响已经被调查了。在该试验中接受了 PTCA 的 2099 名患者被随机地给予安慰剂（ n ＝ 696 ）或 GPIIb/IIIa 拮抗剂 c7E3 Fab （ n ＝ 1403 ）。与安慰剂组相比，接受了很高剂量的肝素（＞ 14,000 单位）的患者的数目比较少，尽管这些接受了 c7E3 Fab 的患者也接受了相似剂量的肝素，但在根据体重进行了校正之后他们都具有明显的高的（ P ＜ 0.001 ） ACT 。

肝素剂量	安慰剂对象%	c7E3 Fab 对象%
＜ 10,000 单位或仅渗透	112 (16)	265 (19)
10,000 单位	220 (32)	497 (36)
10,000-14,000 单位	141 (21)	298 (22)
＞ 14,000 单位	209 (31)	316 (23)

结论是，血小板 GPIIb/IIIa 拮抗剂 c7E3 Fab 将活化凝血时间延长了 35 ～ 40 秒。这一点在肝素剂量辅助治疗法以及在 GPIIb/IIIa 为指导的治疗法中进行冠状动脉治疗时都具有非常重要的意义。

使用单克隆抗血小板 GPIIb/IIIa 受体的抗体防止血管成形术的局部缺血并发症的评价试验的性别差异

进行了使用单克隆抗血小板 GPIIb/IIIa 受体的抗体，即单克隆 c7E3 Fab 抗体防止血管成形术中的局部缺血并发症的评价试验的性别差异研究（见实施例 6 和 7 ）。进行经皮治疗（ PTCA ）的患者在治疗前的不长时间内接受了下述三者之一的盲点处理： c7E3 浓缩药丸并随后进行 12 小时 c7E3 渗透、 c7E3 浓缩药丸或安慰剂。

尽管事实上女性都比男性的年龄稍大，体重稍轻，并且具有更多的心血管危险因素，但是，女性及男性在下列各项目中都没有显出性别差异：死亡频率（ 2.2% vs. 1.3%）， MI(7.5% vs. 6.3%)，紧急 PTCA(2.6% vs. 3.1%)，紧急分流手术（ 1.7% vs. 3.2%），在 30 天内的斯坦特置入、主动脉内气囊泵的放置或复合的对那些局部缺血负作用事件的处理（ 10.5% vs. 11.0%, P = 0.74 ）。对于这些复合处理的已知因素的调整（治疗方案、体重、高血压、外周血管疾病），以及对任何涉及性别的潜在的统计学作用的调整都不会改变这些结果。用 c7E3 Fab 浓缩药丸及其渗透的治疗在两种性别中都对局部失血事件的频率产生了相似的降低。

女性显示出比男性更多的严重失血（ 12.6% vs. 9.8%），需要更多的输血（ PRBC ）（ 19.5% vs, 9.0%）并且具有更高的失血指数（Δ 血细胞比容/3 + PRBC 单位， 2.4 vs. 1.9 ）。在预测失血指数的回归模型中，尽管对已知的失血预测因子进行调整（治疗方案、年龄、体重、开始时的血细胞比容、高血压），性别在统计学上仍旧是独立的预测因子（ P =.0041 ）。

结论是，在接受了高度危险的血管成形术和 c7E3 Fab 治疗以后，女性显示出了比男性更多的失血，但是，在其它的负作用上，并没有显示出增加。

等同物

本技术领域的普通技术人员可以充分理解并且能够使用不超出常规的试验方法而得出本发明所述具体实施方案的等同方案。这些等同物都是本发明的权利要求书所要包括的。

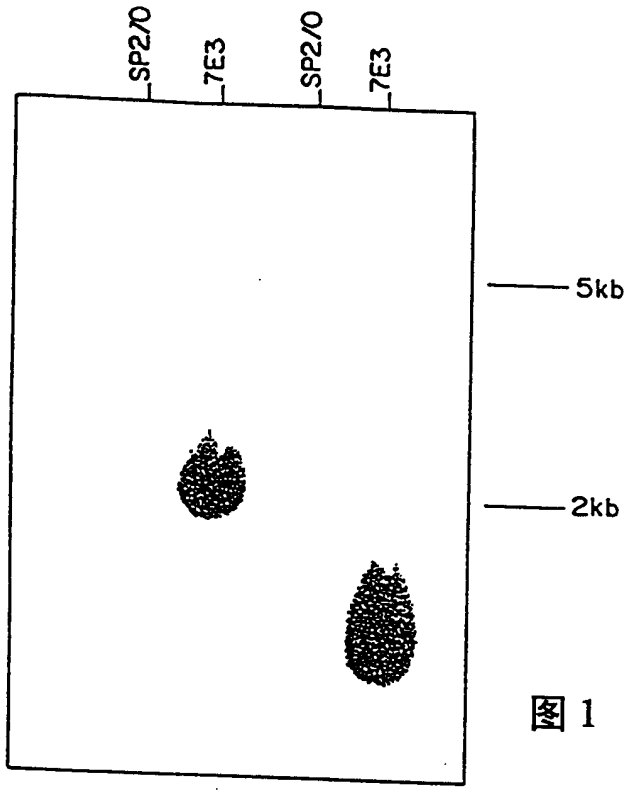

SP2/0
7E3
SP2/0
7E3
5kb
2kb

图 1

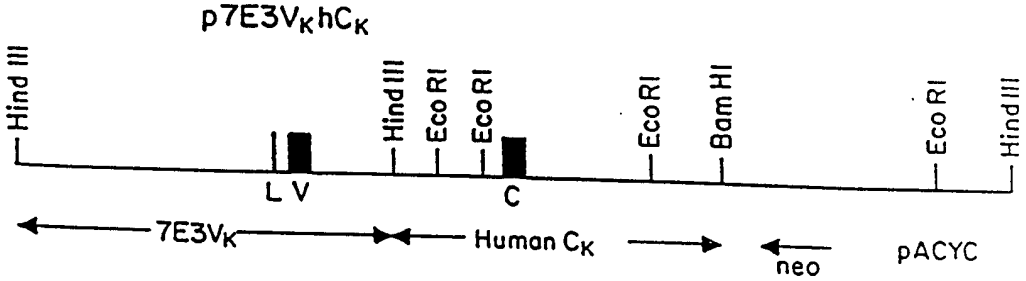

p7E3VKhCK
Hind III
Hind III
Eco RI
Eco RI
Eco RI
Bam HI
Eco RI
Hind III
L V
C
7E3VK
Human CK
neo
pACYC

图 2A

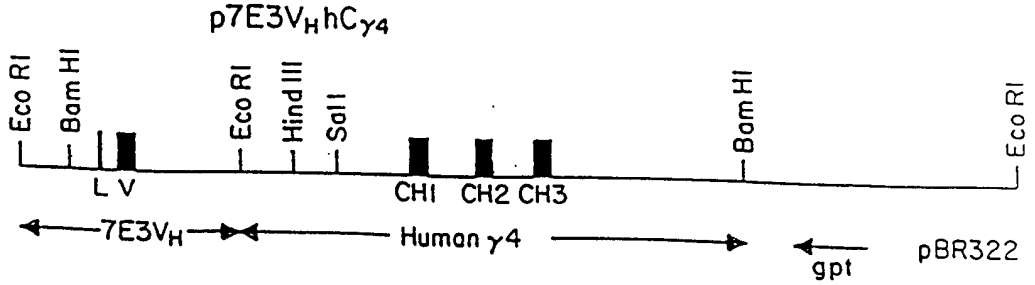

p7E3VHhCγ4
Eco RI
Bam HI
Eco RI
Hind III
Sal I
Bam HI
Eco RI
L V
CH1 CH2 CH3
7E3VH
Human γ4
gpt
pBR322

图 2B

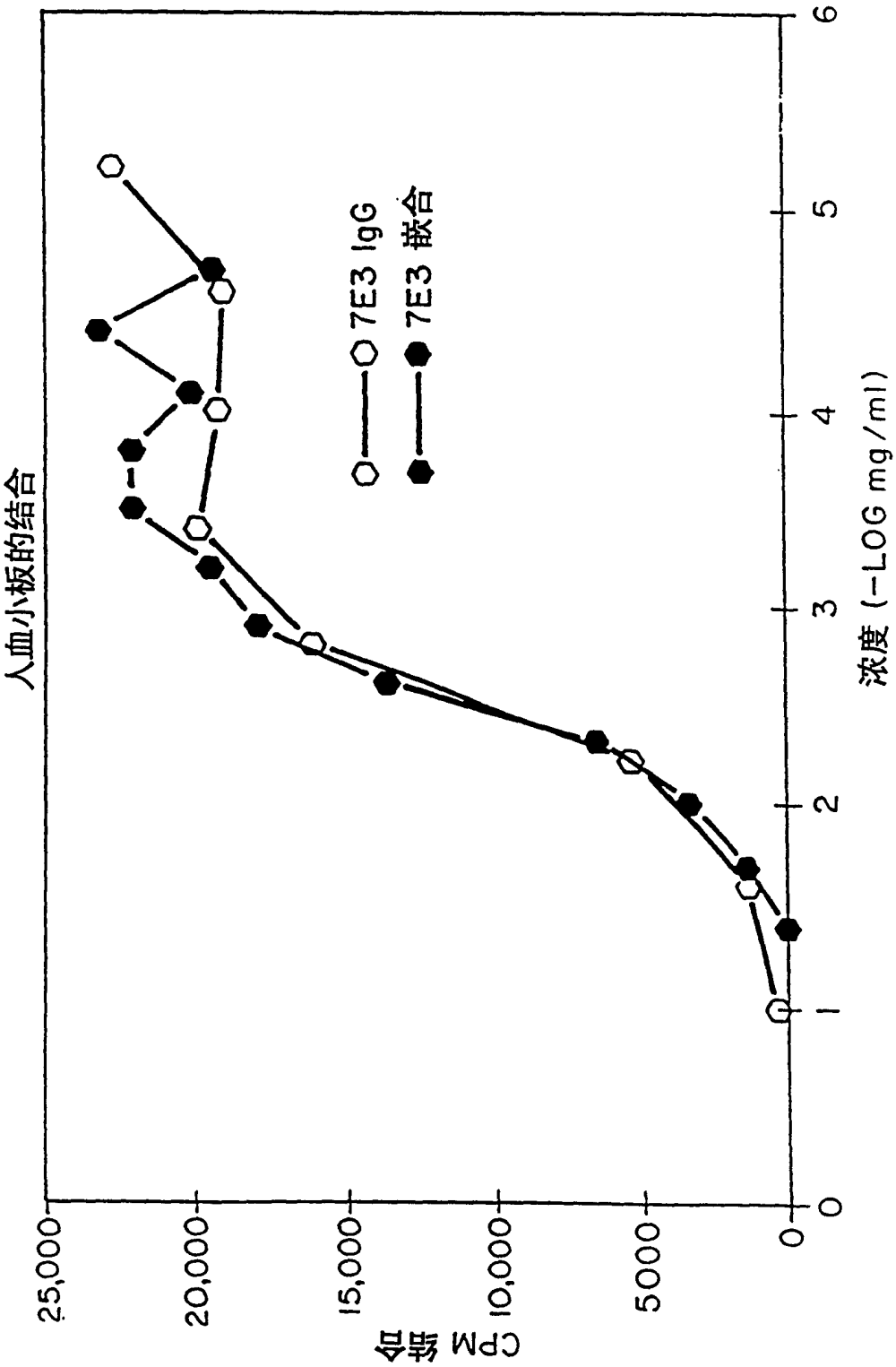

人血小板的结合
CPM 结合
25,000
20,000
15,000
10,000
5000
0
0
1
2
3
4
5
6
浓度 (-LOG mg/ml)
7E3 IgG
7E3 嵌合

图 3

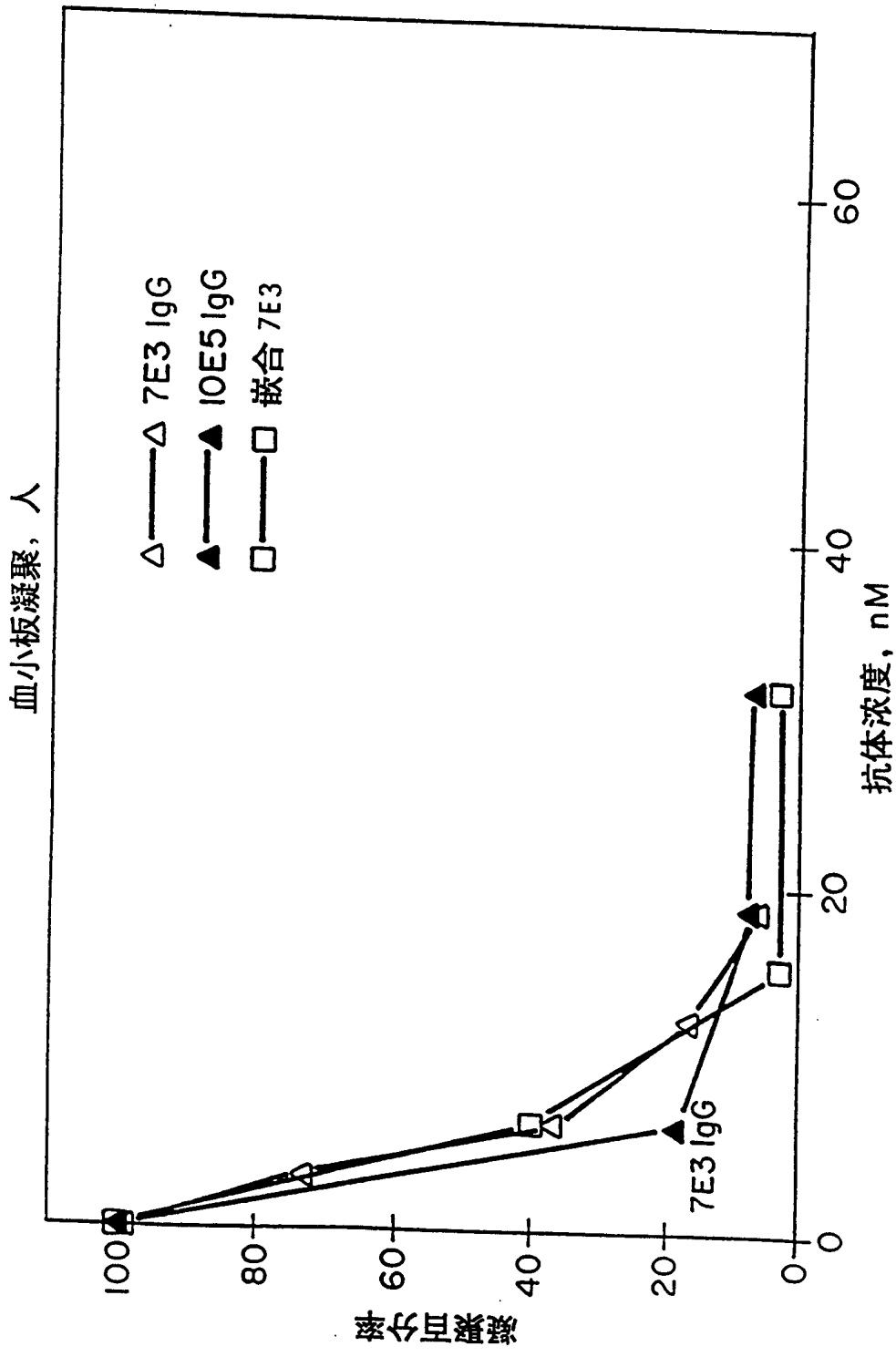

血小板凝聚，人
凝聚百分率
抗体浓度，nM
△ 7E3 IgG
▲ 10E5 IgG
□ 嵌合 7E3
7E3 IgG
0
20
40
60
80
100
0
20
40
60

图 4

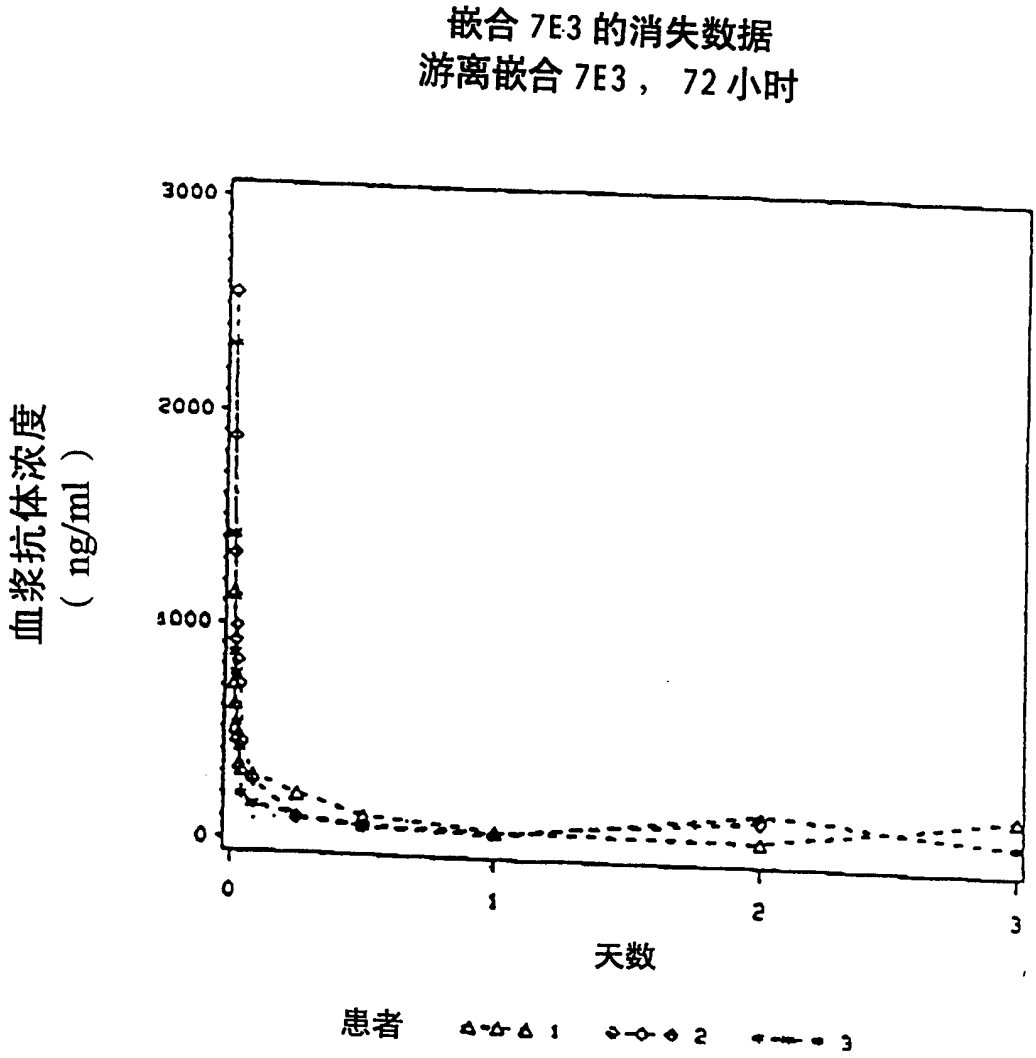

嵌合 7E3 的消失数据
游离嵌合 7E3， 72 小时
血浆抗体浓度
（ ng/ml ）
3000
2000
1000
0
0
1
2
3
天数
患者
1
2
3

图 5

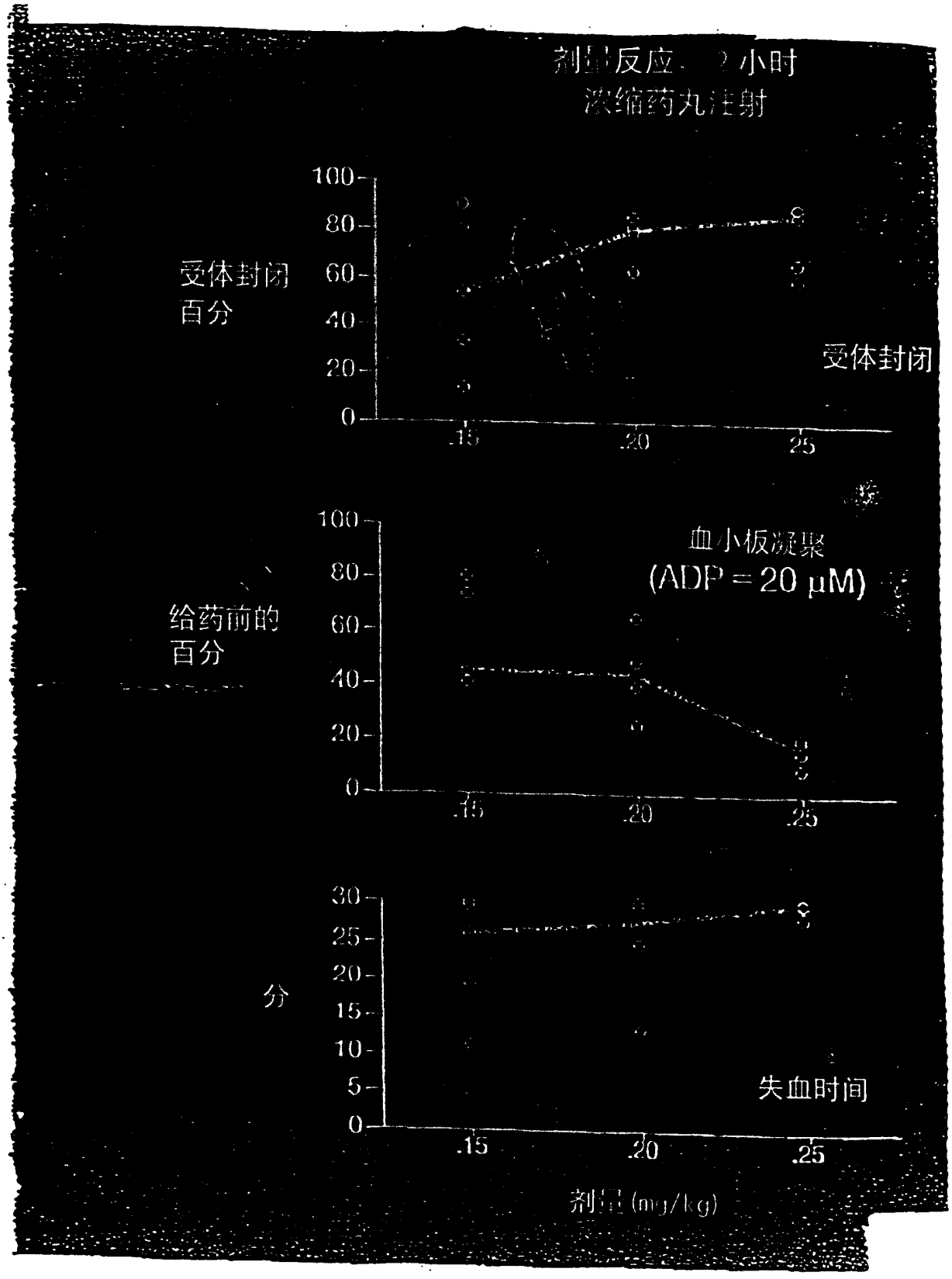

剂量反应 2小时
浓缩药丸注射
受体封闭
百分
100
80
60
40
20
0
.15
.20
.25
受体封闭
血小板凝聚
(ADP = 20 μM)
给药前的
百分
分
30
25
20
15
10
5
失血时间
剂量 (mg/kg)

图 6(A-C)

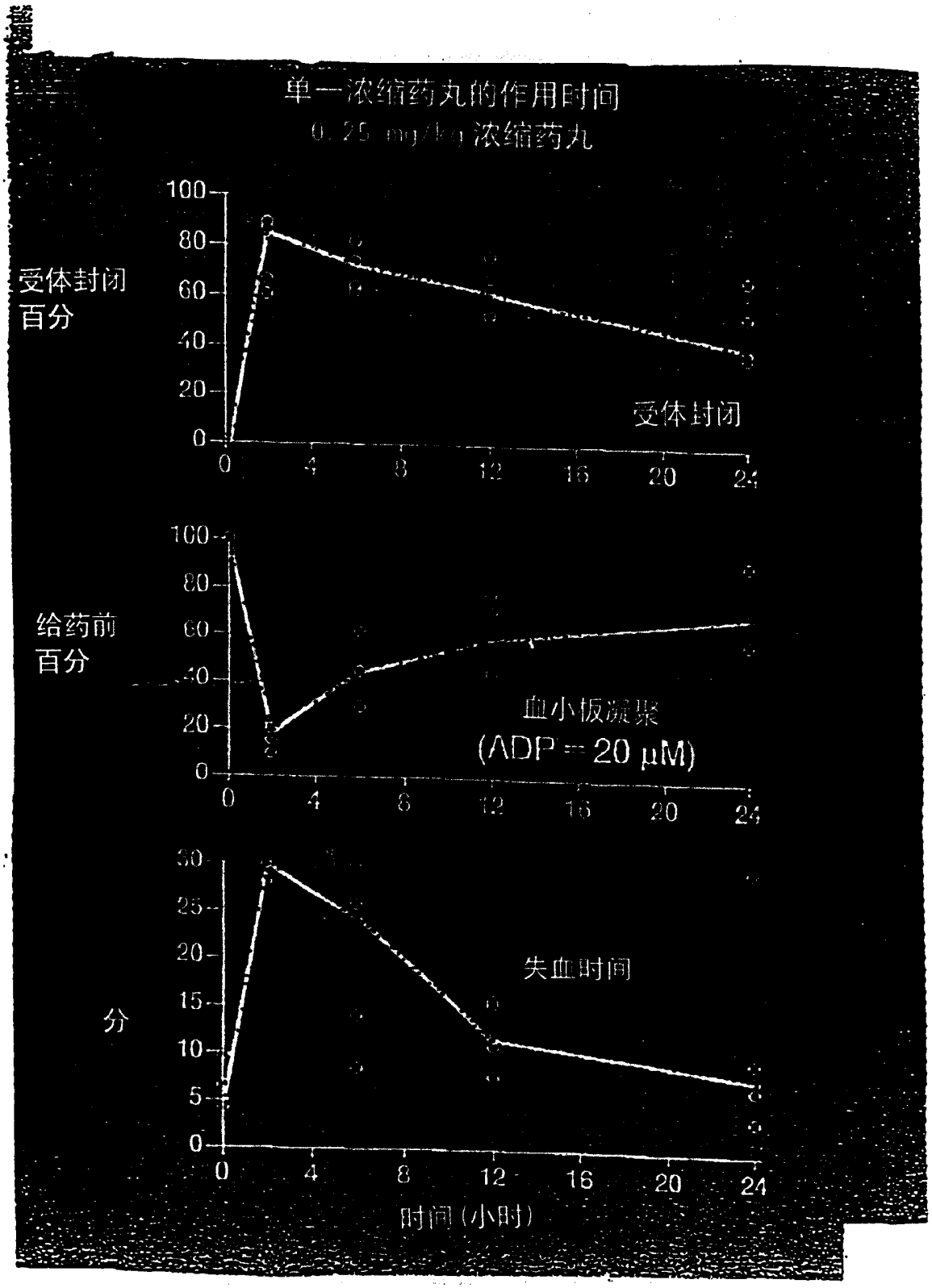

单一浓缩药丸的作用时间
0.25 mg/kg 浓缩药丸
受体封闭
百分
100
80
60
40
20
0
受体封闭
0
4
8
12
16
20
24
给药前
百分
血小板凝聚
(ADP = 20 μM)
分
30
25
20
15
10
5
失血时间
时间(小时)

图 7(A-C)

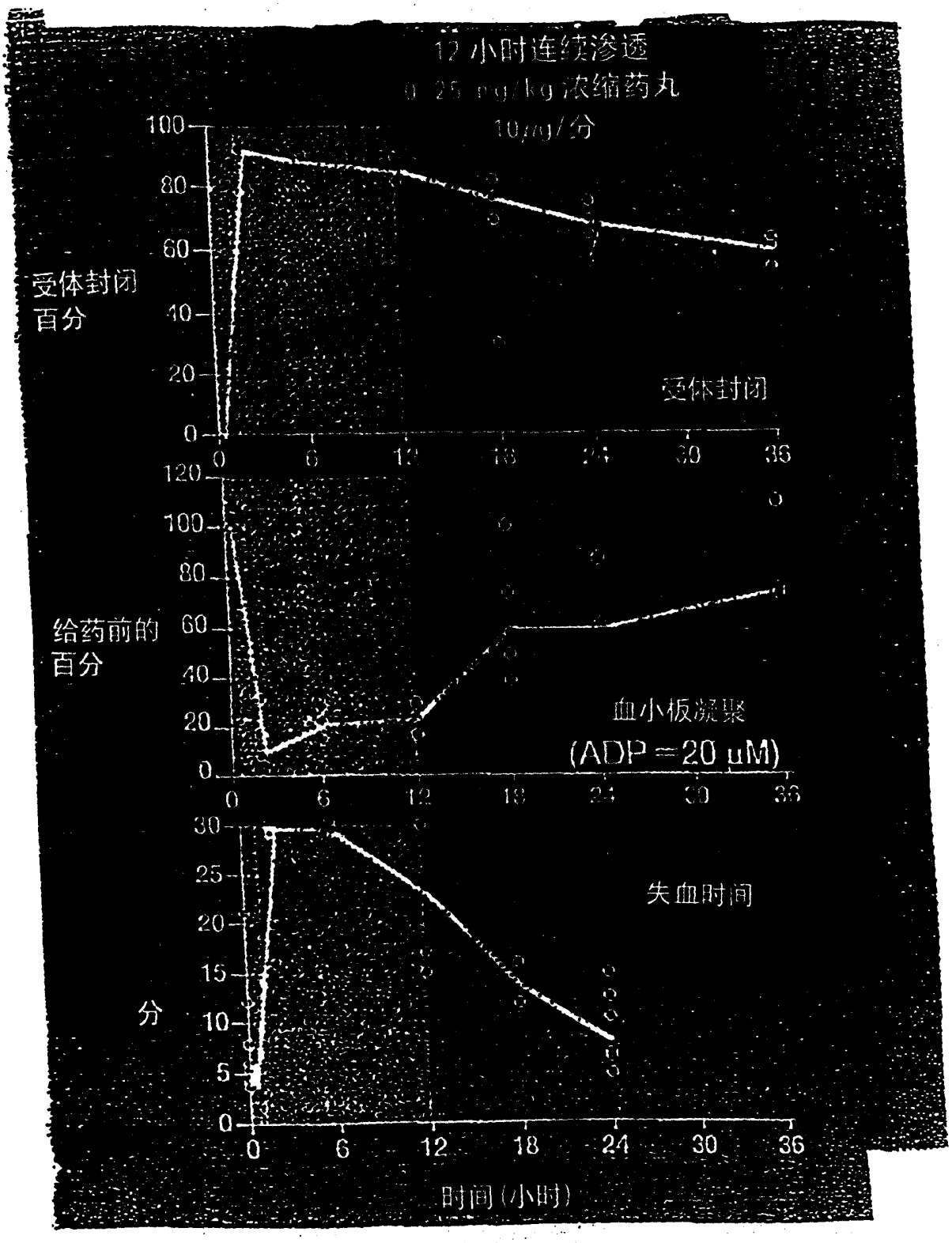

12 小时连续渗透
0.25 mg/kg 浓缩药丸
10/mg/分
受体封闭
百分
100
80
60
40
20
0
受体封闭
0
6
12
18
24
30
36
给药前的
百分
120
100
80
60
40
20
0
血小板凝聚
(ADP＝20 uM)
分
30
25
20
15
10
5
0
失血时间
时间(小时)

图 8(A-C)

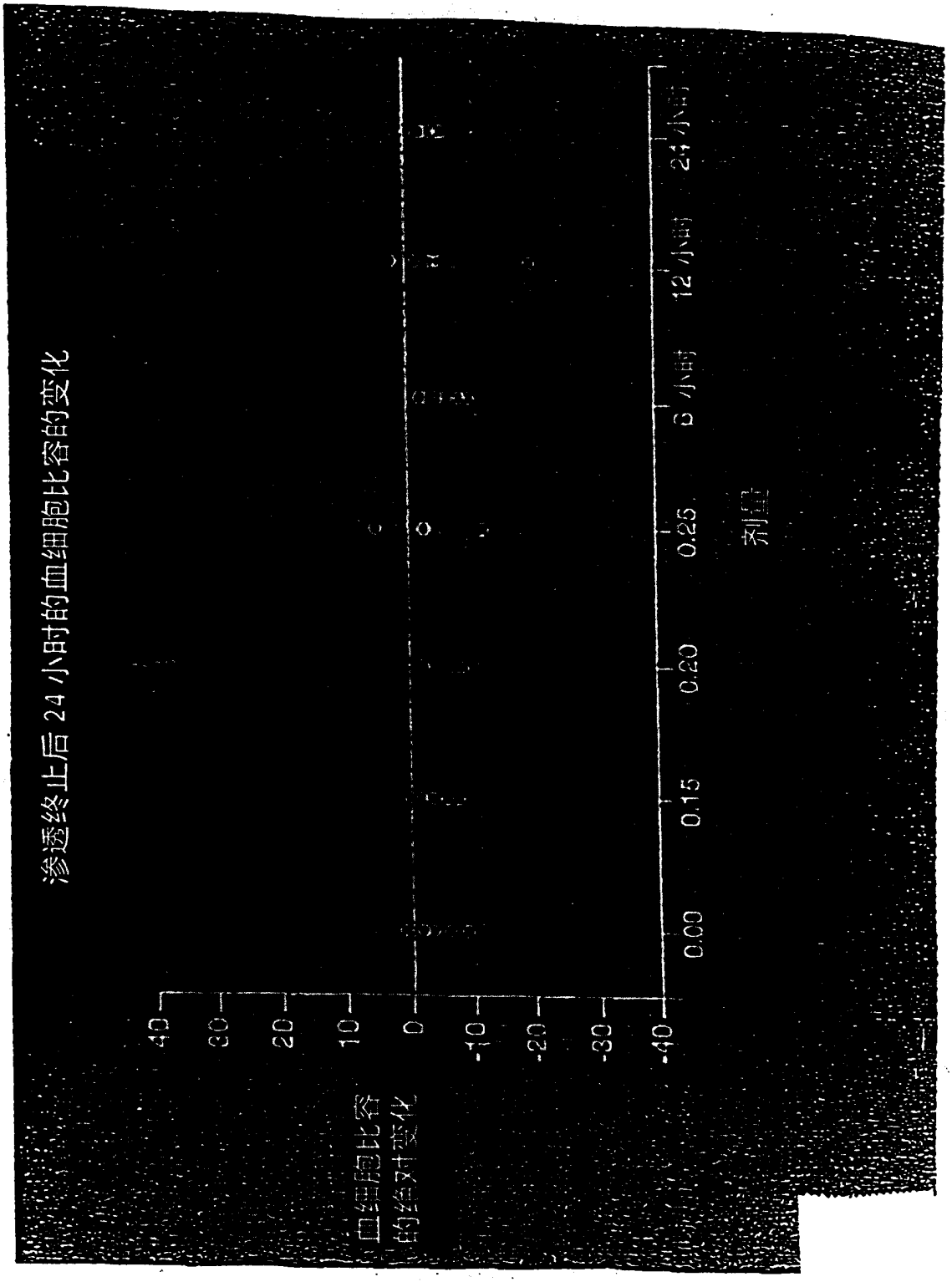

渗透终止后 24 小时的血细胞比容的变化
血细胞比容的绝对变化
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
0.00
0.15
0.20
0.25
剂量
5 小时
12 小时
24 小时

图 9

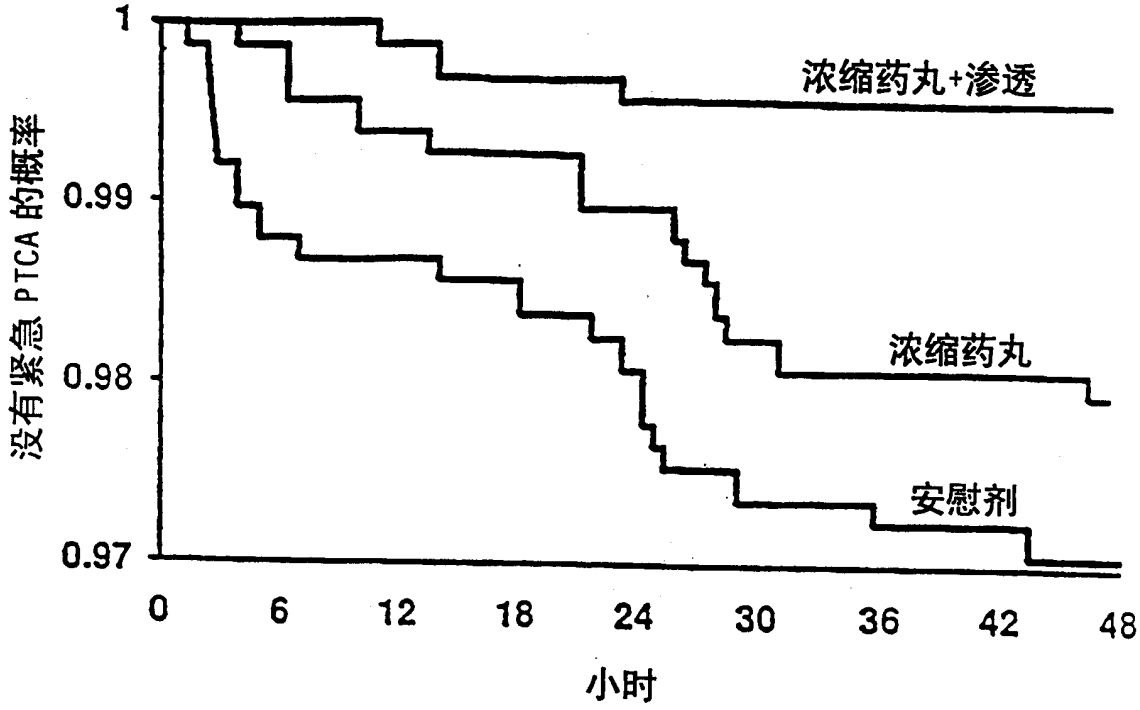

1
0.99
0.98
0.97
没有紧急 PTCA 的概率
浓缩药丸+渗透
浓缩药丸
安慰剂
0
6
12
18
24
30
36
42
48
小时

图 10

主要效果终点

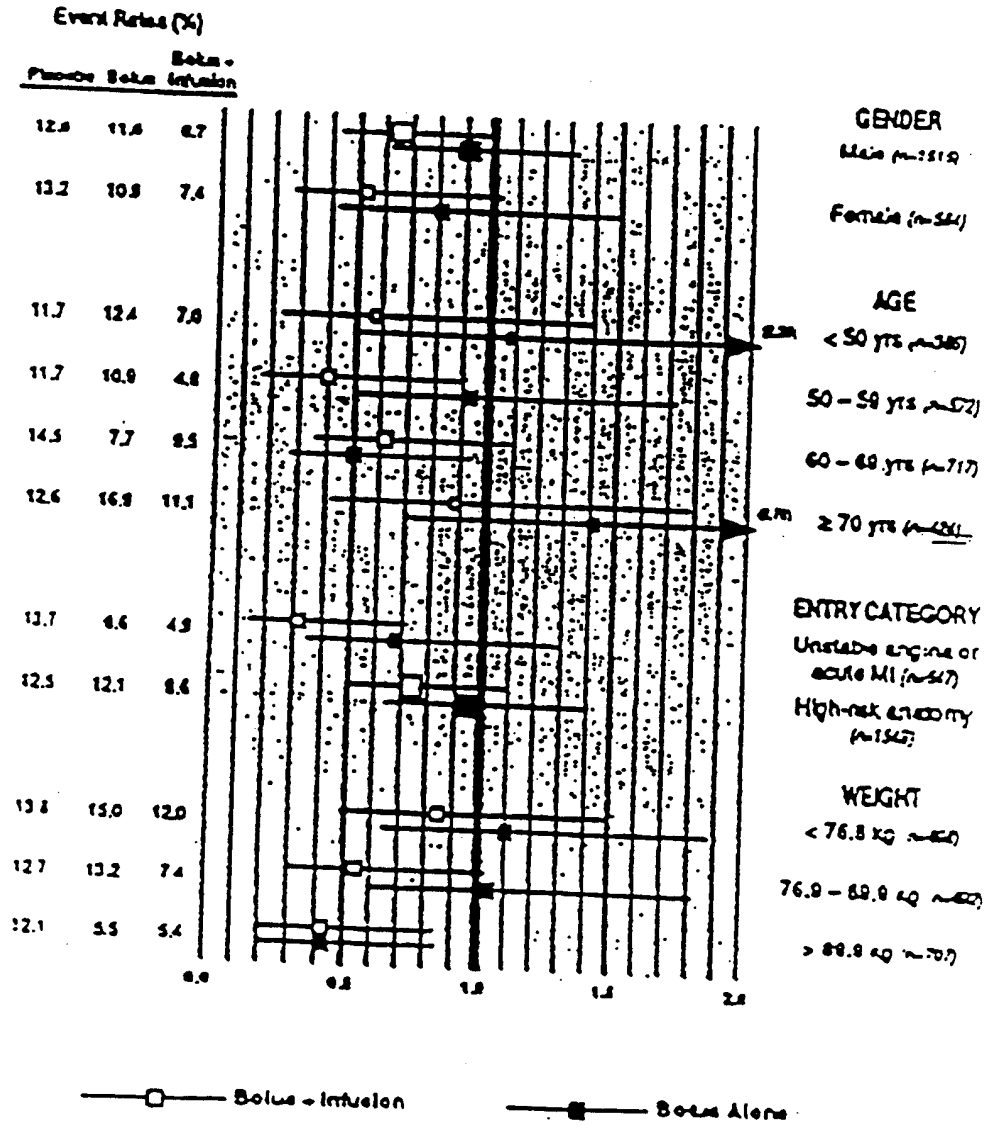

Event Rates (%)
Placebo
Bolus
Bolus + Infusion
12.8
11.6
8.7
13.2
10.8
7.4
11.7
12.4
7.0
11.7
10.0
4.8
14.5
7.7
9.5
12.6
16.9
11.1
13.7
6.6
4.9
12.5
12.1
8.6
13.8
15.0
12.0
12.7
13.2
7.4
12.1
5.5
5.4
0.5
1.0
1.5
2.0
GENDER
Male
Female
AGE
< 50 yrs
50 – 59 yrs
60 – 69 yrs
≥ 70 yrs
ENTRY CATEGORY
Unstable angina or acute MI
High-risk angioplasty
WEIGHT
< 76.8 kg
76.9 – 89.8 kg
> 89.8 kg
Bolus + Infusion
Bolus Alone

图 11

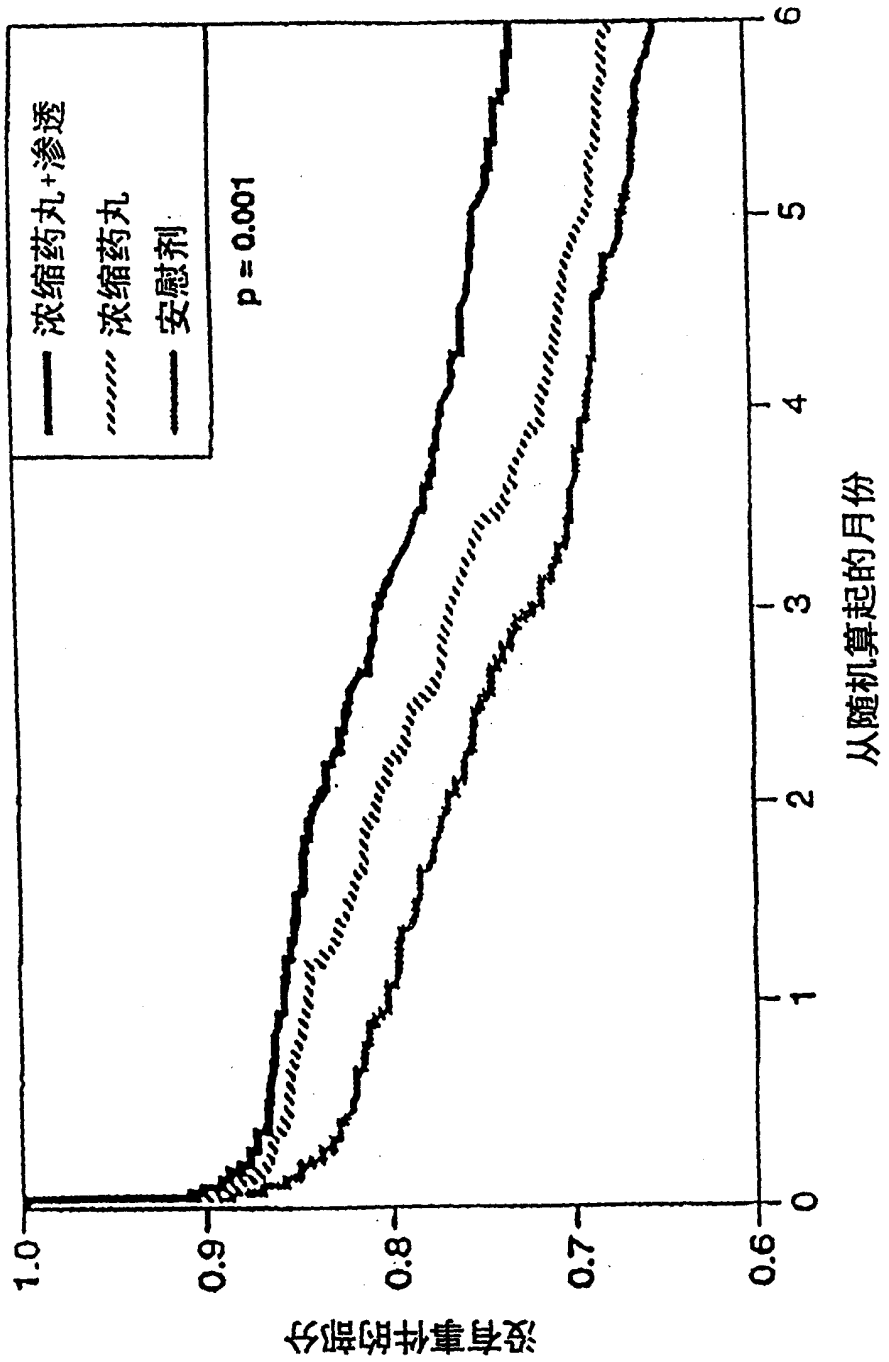

浓缩药丸+渗透
浓缩药丸
安慰剂
p = 0.001
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
没有事件的部分
0
1
2
3
4
5
6
从随机算起的月份

图 12

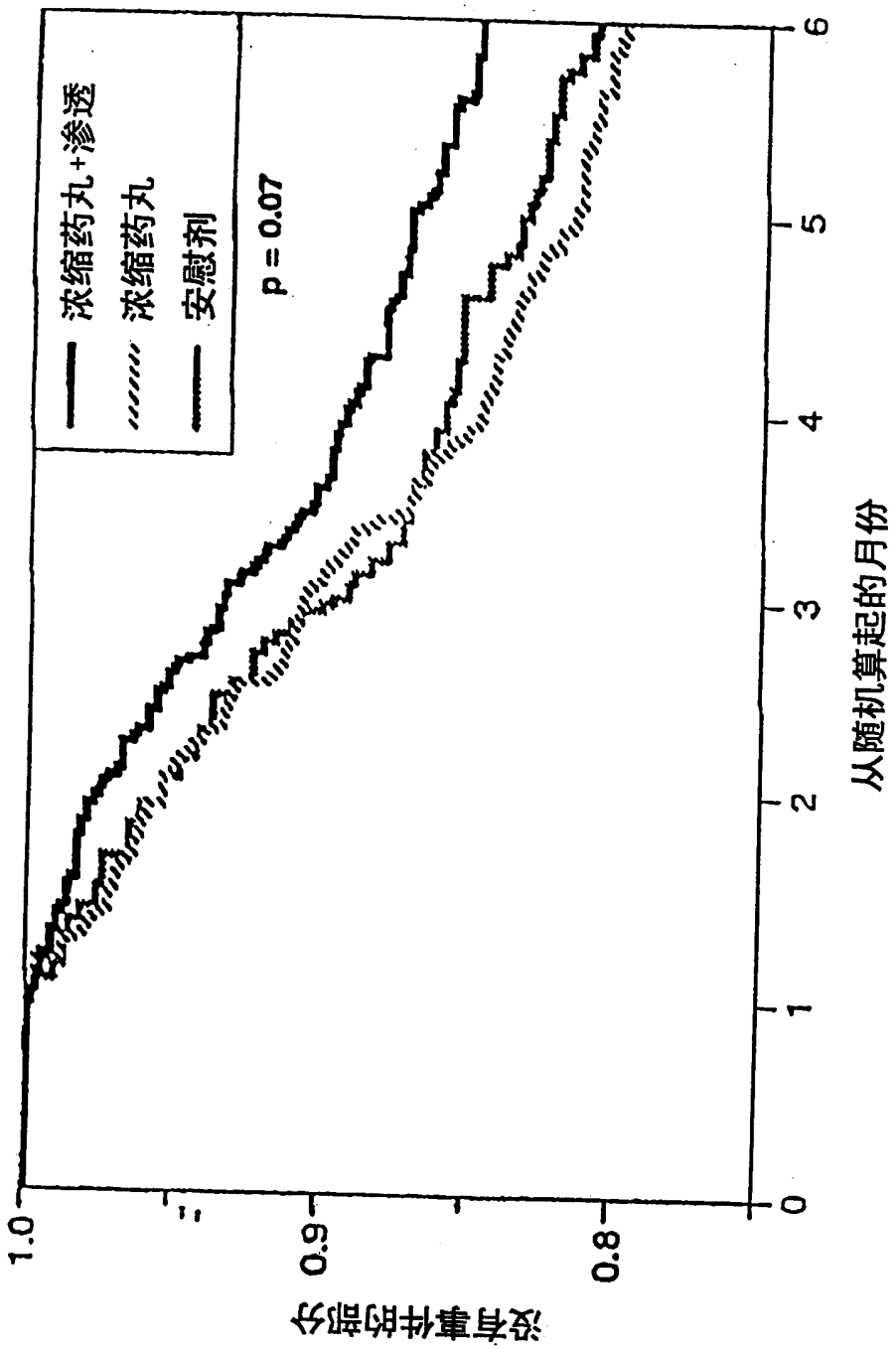


图 13

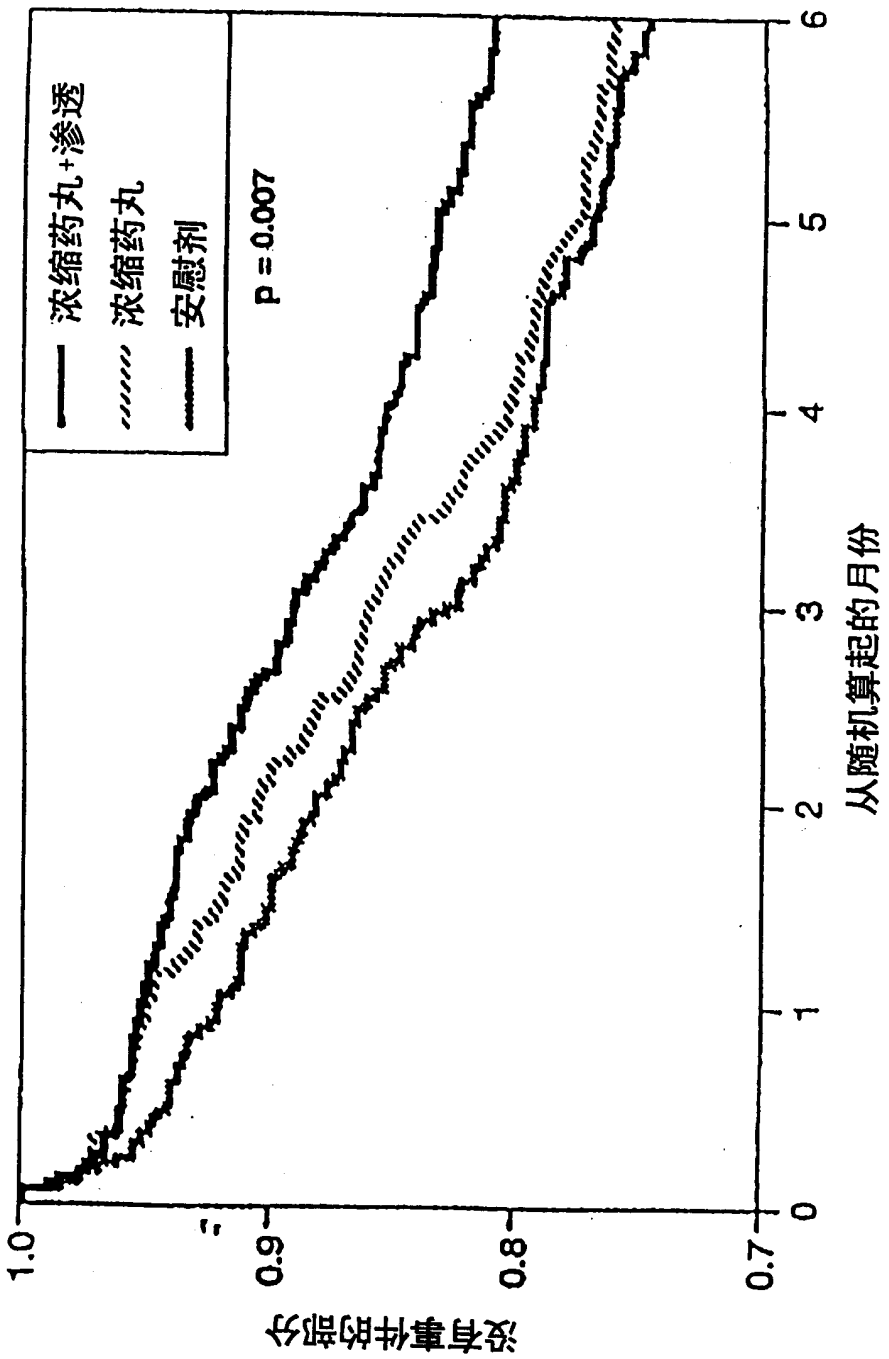


图 14

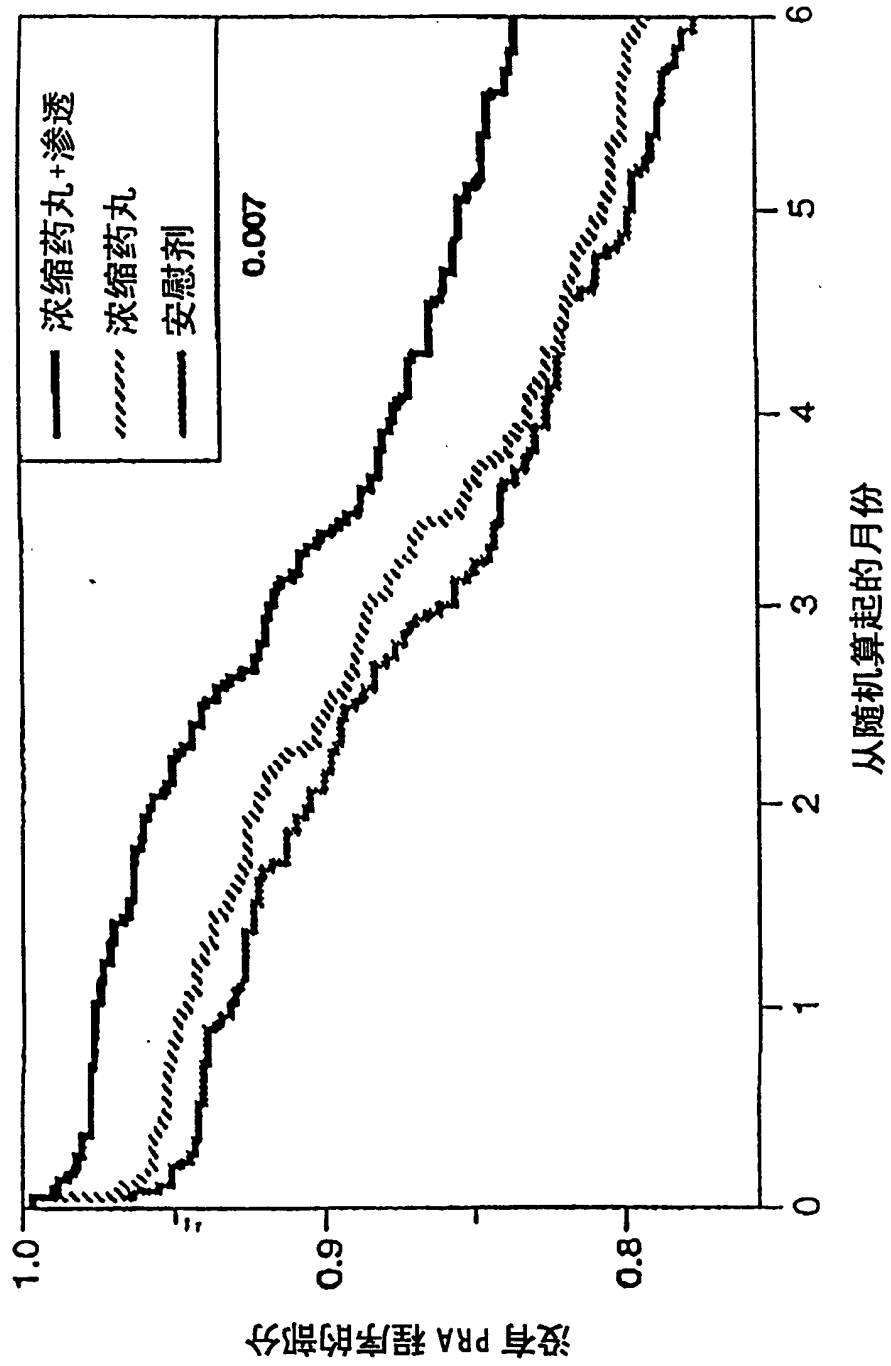


图 15