

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/48

A01N 37/36

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98807818.X

[43]公开日 2000年9月6日

[11]公开号 CN 1265598A

[22]申请日 1998.6.1 [21]申请号 98807818.X

[30]优先权

[32]1997.6.5 [33]US [31]60/048,628

[86]国际申请 PCT/US98/11071 1998.6.1

[87]国际公布 WO98/55142 英 1998.12.10

[85]进入国家阶段日期 2000.1.31

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 B·W·格林尼尔

J·A·亚库波夫斯基

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

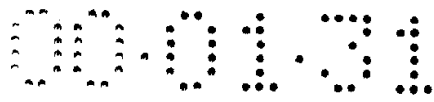
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 治疗血栓形成性疾病的方法

[57]摘要

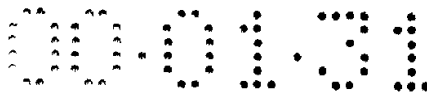
本发明提供治疗各种血栓形成性疾病患者的方法,所述血栓形成性疾病包括但不限于中风、静脉血栓形成、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或 stent 放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。所述治疗是一种人 aPC 和抗血小板药物的联合治疗,所述抗血小板药物包括但不限于阿司匹林(ASA)、clopidogrel、ReoPro[®] (abciximab)、潘生丁、氯吡格雷和 II b / III a 受体拮抗剂。协同作用使得能够降低该联合治疗中所用药物的剂量。

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 一种治疗需要其治疗的病人的血栓形成性疾病的方法, 包括联合一种抗血小板药物给予所述病人药用有效量的活化蛋白C。
- 5 2. 按照权利要求1的方法, 其中所述病人罹患急性血栓形成性中风、静脉血栓形成、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或stent放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。
3. 按照权利要求2的方法, 其中给予的活化蛋白C量为约 $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 至约 $96\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ 。
- 10 4. 权利要求3的方法, 其中所述活化蛋白C通过持续静脉输注约24小时至约144小时给予。
5. 按照权利要求3的方法, 其中所述抗血小板药物选自阿司匹林(ASA)、clopidogrel、abciximab、潘生丁、氯吡噻啶和IIb/IIIa受体拮抗剂或它们的组合物。
- 15 6. 按照权利要求5的方法, 其中所述抗血小板药物是阿司匹林(ASA)。
7. 按照权利要求5的方法, 其中所述抗血小板药物是氯吡噻啶。
8. 按照权利要求5的方法, 其中所述抗血小板药物是
- 20 clopidogrel。
9. 按照权利要求5的方法, 其中所述抗血小板药物是abciximab。
10. 按照权利要求5的方法, 其中所述抗血小板药物是潘生丁。
11. 按照权利要求5的方法, 其中所述抗血小板药物是IIb/IIIa受
- 25 体拮抗剂。
12. 一种治疗需要其治疗的病人的血栓形成性疾病的方法, 包括给予所述病人药用有效量的一种抗血小板药物和活化蛋白C, 使得活化蛋白C的血浆水平达到 $10\text{ng}/\text{ml}$ 至低于 $100\text{ng}/\text{ml}$ 。



13. 权利要求12的方法，其中所述病人罹患急性血栓形成性中风、静脉血栓形成、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或stent放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。

5 14. 权利要求12的方法，其中所述活化蛋白C通过持续静脉输注约24小时至约144小时给予。

15. 权利要求12的方法，其中所述活化蛋白C首先以大剂量注射给予，然后持续静脉输注给予。

16. 按照权利要求5的方法，其中所述抗血小板药物是阿斯匹林(ASA)和clopidogrel。

10 17. 按照权利要求5的方法，其中所述抗血小板药物是阿斯匹林(ASA)和氯吡格雷。

18. 按照权利要求5的方法，其中所述抗血小板药物是阿斯匹林(ASA)和潘生丁。

15 19. 按照权利要求5的方法，其中所述抗血小板药物是阿斯匹林(ASA)和abciximab。

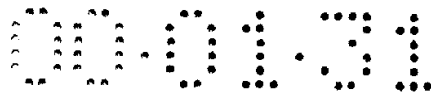
20. 按照权利要求5的方法，其中所述抗血小板药物是阿斯匹林(ASA)和IIb/IIIa拮抗剂。

21. 联合一种抗血小板药物的活化蛋白C，用作治疗血栓形成性疾病的一种药物。

20 22. 权利要求21的用途，其中所述血栓形成性疾病是急性血栓形成性中风、静脉血栓形成、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或stent放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。

23. 权利要求22的用途，其中所述活化蛋白C的剂量为约2 μ g/kg/hr至约96 μ g/kg/hr。

25



说明书

治疗血栓形成性疾病的方法

5 本发明涉及医学科学尤其是用活化的人蛋白C联合抗血小板药物治疗血栓形成性疾病。

10 蛋白C是一种丝氨酸蛋白酶和天然存在的抗凝剂，它通过使凝血级联中的因子Va和VIIIa失活从而在止血调节中发挥作用。人蛋白C以双链酶原循环于体内，它在体内被凝血酶和磷脂表面上的凝血调节蛋白活化，从而产生活化的蛋白C (aPC)。

15 血液凝固是一个非常复杂的过程，受前凝血和抗凝血机制之间的平衡的调节。该平衡决定或者是正常的止血或者是异常病理的血栓形成状态，所述病理血栓形成引起诸如中风、心肌梗塞和静脉血栓形成的事件。两个主要因素控制该平衡，即纤维蛋白的产生和血小板的激活及其随后的聚集。控制以上两个过程的一个重要因素是凝血酶的产生，凝血酶的产生发生于凝血级联激活之后。凝血酶是一种前凝血酶，它使血小板聚集并使循环型纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白，导致形成血凝块。因为凝血酶将蛋白C酶原激活成为活化的蛋白C，该活化的蛋白C再抑制凝血酶的产生，所以它也以有效的抗凝剂发挥作用。因此，aPC通过反馈调节凝血酶的产生，它也可能作为血液凝固最重要的负调节剂发挥作用，从而产生抗血栓形成的保护作用。

25 在杂合型缺陷蛋白C抗性(例如，由常见的因子V Leiden突变引起的)和未治疗的纯合型蛋白C缺陷的致死性后果中血栓形成速率增高，说明了蛋白C在控制止血中的重要作用。在各种静脉和动脉血栓形成动物模型中已经表明，血浆衍生的人活性蛋白C以及重组人活化蛋白C是有效安全的抗血栓形成药物。

在目前的临床实践中，许多文献证明血小板抑制例如使用阿司匹林(ASP)在预防和治疗血栓形成性疾病中是有效的。此外，在诸如心肌梗塞和中风的疾病中，血小板抑制已经成为标准治疗。然而，使

用诸如ASA的抗血小板药物增加了出血风险，从而限制了该药物的剂量和治疗时间。为了阻止凝血酶在纤维蛋白形成中的作用，在急性治疗处理中，肝素仍然是标准抗凝剂。然而，肝素的治疗指数窄，且与显著的出血风险有关，尤其是在联合应用抗血小板药物时。

5 在犬冠状动脉血栓形成模型中已经研究了阿斯匹林和一种合成的凝血酶抑制剂、组织纤溶酶原激活物或单克隆抗血小板糖蛋白IIb/IIIa抗体的联合治疗[Yasuda等, J Am Coll Cardiol, 16:714-22 (1990)]。阿斯匹林联合这些药物使出血时间延长，而并不能防止冠状动脉的再阻塞。另外，已经提出了aPC与诸如组织纤溶酶原激活物、
10 尿激酶或链激酶的溶栓剂的联合治疗[Griffin等, 美国专利第5,350,578号]。然而，还未证实这些联合治疗成功与否。因此，仍然需要鉴定治疗血栓形成性疾病的有效疗法。

 本发明是第一个描述在治疗血栓形成中aPC与抗血小板药物联合的发明。因此，本发明提供aPC联合抗血小板药物用于治疗血栓形成
15 性疾病的应用。该联合治疗使得对各种血栓形成性疾病的疗效提高，所述血栓形成性疾病包括但不限于中风、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或stent放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。此外，aPC与抗血小板药物的联合应用产生协同作用，使得允许减少aPC和抗血小板药物的剂量。联合治疗中所述药物
20 剂量的减少又使得诸如出血倾向增高的副作用降低，所述副作用在联合抗凝剂/抗血小板治疗中常常观察到。

 本发明提供治疗需要其治疗的病人的血栓形成性疾病的方法，它包括与一种抗血小板药物联合，给予所述病人药用有效量的活化蛋白C。此外，本发明提供治疗需要其治疗病人的血栓形成性疾病的方法，包括给予所述病人药用有效量的抗血小板药物和活化蛋白C，从而使得活化蛋白C血浆水平为10ng/ml至低于100ng/ml。
25

 为了本发明，如本文说明书和权力要求书所述，下列术语定义如下。

5 无论是重组还是血浆衍生的aPC或活化蛋白C，aPC包括并最好是人蛋白C，尽管aPC也可以包括其它物种的aPC或具有蛋白C蛋白水解活性、酰胺分解活性、酯解活性以及生物活性(抗凝活性或纤维蛋白原分解活性)的衍生物。Gerlitz等的美国专利第5,453,373号和Foster等，美国专利第5,516,650号描述了蛋白C衍生物的实例，所述文献的全部知识通过引用结合到本文中。

APTT - 活化部分凝血致活酶时间。

HPC - 人蛋白C酶原。

10 r-hPC - 在原核细胞、真核细胞或转基因动物中产生的重组人蛋白C酶原。

r-aPC - 重组人活化蛋白C，它通过体外激活r-hPC产生或由原核细胞、真核细胞或转基因动物直接分泌活化形式的蛋白C [Cottingham, WO97/20043]，包括例如以酶原从人肾293细胞分泌，然后用本领域技术人员熟知、在Yan的美国专利第4,981,952号中证实的技术纯化和活化，所述文献的全部知识通过引用结合到本文中。

酶原 - 是指分泌的非活性形式的单链或双链蛋白C。

20 抗血小板药物 - 降低血小板聚集能力的单独或组合的一种或多种药物。本领域已知并鉴定的药物包括在例如Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, 第II卷, 第924-25页, Mack Publishing Co.中引用的药物，该文献通过引用结合到本文中。这类药物包括但不限于阿斯匹林(ASA)、clopidogrel、ReoPro[®](abciximab)、潘生丁、氯吡格雷和IIb/IIIa拮抗剂。

25 治疗 - 是指为了防御疾病、病症或紊乱对病人的处理及护理，包括给予本发明化合物，以防止症状或并发症的发生，缓解所述症状或并发症，或解除疾病、病症或紊乱。

连续输注 - 特定时间内基本上不间断地持续将一种溶液导入静脉内。

大剂量注射 - 于高达约120分钟的时间内注射给定量(称为大剂量)

的药物。

药用有效量 - 指本发明化合物能够抑制哺乳动物血栓形成性疾病的量。当然，主治医师对该病例的特定情况包括所给予的化合物、待治疗的特定病症以及类似情况的考虑，确定按照本发明给予的化合物的具体剂量。

血栓形成性疾病 - 涉及或受血管内形成或存在的凝血块影响的疾病。血栓形成性疾病包括但不限于中风、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或stent放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。

本发明优选涉及用活化蛋白C联合抗血小板药物治疗血栓形成性疾病。在这种组合中所用的aPC可以按照已知方法配制，以制备药理学上有用的组合物。通过连续输注约24小时至约144小时注入合适剂量，胃肠外给予所述aPC，以保证将其以有效形式传递入血流。

在与抗血小板药物的联合治疗中，所给予的aPC量为约4mg/70Kg/24小时至160mg/70Kg/24小时，或者等同表示为0.1mg/m²至4mg/m²或者2μg/kg/hr至96μg/kg/hr。所给予的aPC量更优选为约4mg/70Kg/24小时至120mg/70Kg/24小时，或者等同表示为0.1mg/m²至3mg/m²或者2.4μg/kg/hr至72μg/kg/hr。而所给予的aPC量更优选为约4mg/70Kg/24小时至80mg/70Kg/24小时，或者等同表示为0.1mg/m²至2mg/m²或者2.4μg/kg/hr至48μg/kg/hr。所给予的aPC的量甚至更优选为约4mg/70Kg/24小时至60mg/70Kg/24小时，或者等同表示为0.1mg/m²至1.5mg/m²或者2.4μg/kg/hr至36μg/kg/hr。所给予的aPC的量甚至再更优选为约10mg/70Kg/24小时至50mg/70Kg/24小时，或者等同表示为0.25mg/m²至1.25mg/m²或者6μg/kg/hr至30μg/kg/hr。所给予的aPC的量甚至再更优选为约20mg/70Kg/24小时至40mg/70Kg/24小时，或者等同表示为0.5mg/m²至1.0mg/m²或者12μg/kg/hr至24μg/kg/hr。所给予aPC的最优选量为约40mg/70Kg/24小时，或者等同表示为1.0mg/m²或者24μg/kg/hr。与抗血小板治疗药物一起给予合适剂量的aPC，将使得或

者提高疗效或者减少其中之一或者两种药物的剂量。

给予上述量aPC所获得的血浆浓度范围为2ng/ml至低于100ng/ml。优选血浆浓度范围从约20ng/ml至80ng/ml。最优选血浆浓度范围从约30ng/ml至约60ng/ml，甚至更优选约50ng/ml。

5 或者，所述aPC的给予采取以大剂量注射注入每小时合适剂量的三分之一，接下来连续输注每小时剂量的余下三分之二1小时，之后连续输注合适剂量23小时，这使得24小时给予合适剂量。

术语“联合”是指抗血小板药物与aPC同时、序贯或者组合给予。血小板抑制剂与aPC联合给予将提高各种血栓形成性疾病的治疗效能，所述疾病包括但不限于中风、静脉血栓形成、心肌梗塞、不稳定型心绞痛、血管成形术或stent放置术后突发性血管闭塞以及外周血管手术引起的血栓形成。该协同作用也使得能够降低联合治疗中的药物剂量，从而使得降低在联合抗凝剂/抗血小板治疗中常常观察到的诸如出血倾向增高的副作用。

15 所用抗血小板药物和合适的剂量水平是本领域已知并接受的。技术人员知道每种抗血小板药物获得治疗血栓形成性疾病的药用有效量的所用的合适剂量水平。在本发明中适合应用的抗血小板药物包括但不限于临床认可并有市售的药物，诸如阿斯匹林(ASA)、clopidogrel、ReoPro[®](abciximab)、潘生丁、氯吡格雷和IIb/IIIa拮抗剂。与aPC联合给予的抗血小板药物阿斯匹林(ASA)的量为约10mg-1000mg，一日一次。与aPC联合给予的抗血小板药物氯吡格雷的量为约50mg-1250mg，一日两次(B.I.D.)。与aPC联合给予的抗血小板药物潘生丁的量为约15mg-500mg，一日四次。与aPC联合给予的抗血小板药物clopidogrel的量为约40mg-1000mg，一日一次。与aPC联合给予的抗血小板药物ReoPro[®](abciximab)的量为约0.025 μ g/kg/min-1 μ g/kg/min，12小时静脉输注给予。或者，与aPC联合给予的ReoPro[®]可以以约0.05mg/kg-1.0mg/kg大剂量注射。此外，与aPC联合给予的ReoPro[®]可以以大剂量注射，然后静脉输注12小时。根据使用的具体

药物，与aPC联合使用的IIb/IIIa拮抗剂的量为约0.1mg/kg至约100mg/kg [参见例如Fisher等，美国专利第5,618,843号，其全部知识通过引用结合到本文中]。本领域技术人员能够确定用以获得药用有效量的合适剂量水平。

5 与抗血小板药物联合使用的aPC提高单独的抗血小板药物的抗血栓形成作用。因此，该联合治疗可以减少aPC的治疗剂量和减少治疗性治疗血栓形成需要的抗血小板药物的剂量，由此避免诸如出血倾向的并发症、高剂量抗血小板药物的毒性以及一般副反应。

10

制备1

人蛋白C的制备

15

20

重组人蛋白C (r-hPC)通过技术人员熟知的技术在人肾293细胞中生产，所述技术诸如在Yan，美国专利第4,981,952号中提出的技术，该文献全部知识通过引用结合到本文中。编码人蛋白C的基因在Bang等，美国专利第4,775,624号中公开并要求保护，该专利全部知识通过引用结合到本文中。用来在293细胞中表达人蛋白C的质粒是在Bang等，美国专利第4,992,373号中公开的质粒pLPC，所述专利的全部知识通过引用结合到本文中。质粒pLPC的构建也描述于欧洲专利公告第0 445 939号和Grinnell等，1987, Bio/Technology 5: 1189-1192，所述文献的知识也通过引用结合到本文中。简而言之，将该质粒转染入293细胞，然后鉴定、传代培养稳定的转化体并使其在无血清培养基中生长。发酵后，通过微量过滤获得无细胞培养液。

25

采用修改的Yan,美国专利第4,981,952号的技术，从培养液分离人蛋白C，所述专利的全部知识通过引用结合到本文中。在澄清培养液吸附到阴离子交换树脂(Fast-Flow Q, Pharmacia)之前制备其4mM EDTA液。用4倍柱体积的20mM Tris, 200mM NaCl, pH 7.4和2倍柱体积的20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.4洗涤后，用20mM Tris, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7.4洗脱结合的重组人蛋白C酶原。洗脱后按照

SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳判定, 该洗脱蛋白的纯度高于95%。

制备所述蛋白的3M NaCl液, 然后吸附到已在20mM Tris, 3M NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7.4中平衡的疏水作用树脂(Toyopearl Phenyl 650 M, TosoHaas), 从而完成该蛋白的进一步纯化。用2倍柱体积无 CaCl₂的平衡缓冲液洗涤后, 用20mM Tris, pH 7.4洗脱该重组人蛋白 C。

通过去除残余钙制备用于活化的洗脱蛋白。使该重组人蛋白C通过金属亲和柱(Chelex-100, BioRad)以去除钙并再结合到阴离子交换剂(Fast-Flow Q, Pharmacia)。这两种柱子连续串联排列并用20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 Mm EDTA, pH 6.5平衡。将该蛋白加样后, 用一倍柱体积的相同缓冲液洗涤Chelex-100柱, 然后将其中断串联。所述阴离子交换柱用3倍柱体积的平衡缓冲液洗涤, 然后用0.4M NaCl, 20mM Tris-乙酸盐, pH 6.5洗脱该蛋白。分别用UV 280 nm消光E^{0.1%}=1.81或1.85测定重组人蛋白C和重组活化蛋白C溶液的蛋白浓度。

15

制备2

重组人蛋白C的活化

将牛凝血酶在存在50mM HEPES, pH 7.5的情况下于4℃偶联至活化的CH-Sepharose 4B (Pharmacia)。采用约5000单位凝血酶/ml树脂, 当树脂装入柱中进行所述偶联反应。所述凝血酶溶液循环通过所述柱子约3小时, 然后加入MEA成为0.6ml/l浓度的循环液。该含MEA的溶液再循环10-12小时, 以确保完全封闭所述树脂上未反应的胺。封闭后, 所述凝血酶偶联树脂用10倍柱体积的1M NaCl, 20mM Tris, pH 6.5洗涤以去除所有非特异性结合的蛋白, 并在活化缓冲液中平衡后用于活化反应。

25

制备纯化r-hPC的5mM EDTA液(以螯合任何残余钙), 并用20mM Tris, pH 7.4或20mM Tris-乙酸盐, pH 6.5稀释为2mg/ml浓度。将该物质通过于37℃用50mM NaCl和或20mM Tris pH 7.4或20mM Tris-乙酸

5 盐pH 6.5平衡的凝血酶柱。调节流速以允许该r-hPC与凝血酶树脂接触时间近20min。收集流出液并立即检测酰胺分解活性。假如该物质无相当于aPC确立的标准的比活(酰胺分解活性), 则将其再循环通过凝血酶柱完全活化所述r-hPC。之后用7.4至6.0之间任何pH (pH of anywhere between 7.4 or 6.0) (优选较低pH以防止自动降解)的上述20mM缓冲液1: 1稀释该物质, 以保持aPC于较低浓度, 而待下一加工步骤使用。

10 通过将所述aPC结合至阴离子交换树脂(Fast Flow Q, Pharmacia), 完成从aPC物质去除浸提的凝血酶, 所述阴离子交换树脂已在含150mM NaCl的活化缓冲液(或者为20mM Tris, pH 7.4或者优选20mM Tris-乙酸盐, pH 6.5)中平衡。使凝血酶通过该柱, 并在经过用20mM平衡缓冲液的2-6个柱体积洗涤期间进行洗脱。结合的aPC用采用0.4M NaCl的或者5mM Tris-乙酸盐pH 6.5或者20mM TrispH 7.4的阶式梯度进行洗脱。较大体积洗涤液洗涤该柱有助于更彻底去除所述十二肽。从该柱子洗脱的物质或者以冷冻液(-20℃)或者作为冻干粉贮藏。

15 采用Beckman DU-7400二极管矩阵分光光度计, 通过由购自Kabi Vitrum的合成底物H-D-Phe-Pip-Arg-对硝基酰基苯胺(S-2238)释放的p-硝基苯胺, 测定aPC的酰胺分解活性(AU)。一个单位的活化蛋白C定义为: 采用于450nm下 $9620\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的对硝基苯胺的消光系数, 于25℃、pH 7.4在1分钟内释放 $1\mu\text{mol}$ 对硝基苯胺所需要的酶量。

20 通过检测活化部分凝血致活酶时间(APTT)凝血测定中凝血时间的延长, 从而测定活化蛋白C的抗凝活性。用蛋白C浓度范围125-1000ng/ml的稀释缓冲液(1mg/ml放免检测级BSA, 20mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.02% NaN_3)制备标准曲线, 同时在该浓度范围内制备几个稀释度的样品。于每一样品池加入 $50\mu\text{l}$ 冷马血浆和 $50\mu\text{l}$ 重建的活化部分凝血致活酶时间试剂(APTT试剂, Sigma), 并于37℃温育5分钟。温育后, 于每一小池加入 $50\mu\text{l}$ 合适的样品或标准品。用稀释缓冲液取代样品或标准品以确定基础凝血时间。在加入 $50\mu\text{l}$ 37℃ 30mM

CaCl₂至每个样品或标准品池时，启动纤维蛋白仪(fibrometer)计时器 (CoA Screener Hemostasis Analyzer, American Labor)。由标准曲线的线性回归公式计算样品中的活化蛋白C浓度。本文报告的凝血时间是至少三个复份的均值，包括标准曲线样品。

5

制备3

活化蛋白C的制剂

用包括冷冻干燥溶液的方法制备活化蛋白C的稳定冻干制剂，所述溶液含有约2.5mg/ml活化蛋白C、约15mg/ml蔗糖、约20mg/ml NaCl和pH高于5.5但是低于6.5的柠檬酸钠缓冲液。活化蛋白C的稳定冻干配制还包括冻干包含约5mg/ml活化蛋白C、约30mg/ml蔗糖、约38mg/ml NaCl和pH高于5.5但是低于6.5的柠檬酸盐缓冲液的溶液。

10

15

aPC:盐:填充剂的比率(w:w:w)是在适合冷冻干燥法的配制中的重要因素。所述比率的变化取决于aPC浓度、盐的选择和浓度以及填充剂的选择和浓度。具体地说，优选比率为约1份活化蛋白C:约7.6份盐:约6份填充剂。

20

通过混合活化蛋白C、NaCl、蔗糖和柠檬酸钠缓冲液，制备用于适合连续静脉输注给药的单位剂量活化蛋白C制剂。混合后，将4ml该溶液转移至一个单位剂量容器，并冻干。密封含有约5mg至约20mg活化蛋白C的单位剂量容器并贮藏备用，所述单位剂量容器含有的活化蛋白适合给予需要其的病人约0.01mg/kg/hr至约0.05mg/kg/hr的剂量。

实施例1

25

豚鼠动静脉短路的血栓形成模型

因为已经证明了血小板抑制的临床效果和aPC在控制止血中起着重要作用，所以在豚鼠动脉/静脉(AV)短路血栓形成模型中检测aPC与ASA之间可能的协同作用。在该血栓形成模型中，已经表明aPC是有

效的抗血栓形成药物，导致剂量依赖性地抑制血栓形成。

5 为了检测aPC和阿斯匹林的作用，用20mg/kg Rompun和125mg/kg Ketaset麻醉豚鼠(约500g)，并插入分流管将右侧颈动脉和左侧颈静脉连接起来。所述分流管含有刺激血栓形成的棉纤维。用大剂量注射加
10 静脉输注给药方案(0.5mg/kg大剂量加3mg/kg/hr)给予aPC以抑制血栓形成。此外，在给予所述给药方案之前和期间进行全血aPTT检测，并通过免疫捕获酰胺分解测定法检测循环的aPC血浆水平。以10mg/kg静脉给予阿斯匹林，而在肝素研究中，采用先给予一剂30单位/kg大剂量，接着静脉输注40单位/kg/hr。通过左侧颈静脉的插管进行大剂
15 量给药，通过右侧颈静脉插管进行血样品采集。于连续时间点将血样品采集到含300mM盐酸苯甲脒的3.8%柠檬酸钠(9体积血：1体积柠檬酸盐/苯甲脒溶液)中。在动物每次采血后用注入等体积盐水。离心分离血浆并冻藏于-20℃。用免疫捕获酰胺分解测定检测aPC的血浆浓度。

15 为了检测aPC和抗血小板药物ASA之间潜在抗血栓形成的协同作用，通过抑制血栓烷B2释放进行检测，选择ASA剂量以产生几乎完全抑制血小板环加氧酶。如表1所示，10mg/kg ASA的剂量有效抑制血
20 小板环加氧酶，然而，它对血栓重量无明显影响。采用不影响血栓重量的该ASA剂量，进行与aPC联合的实验。为了可比较的目的，也比较标准临床抗凝血剂肝素。如表2所示，选择aPC和肝素的剂量，以使每一种在所述模型中产生大致相同的抗血栓形成效应(分别抑制45.9
25 和43.3%)。ASA和aPC的联合引起的血栓形成抑制作用显著强于单独用aPC所观察到的抑制作用($P=0.01$)。相反，抗凝剂肝素和ASA的联合显示，并不明显强于单独用肝素所观察到的抑制效应。这些资料证实了抗血小板药物和aPC之间的协同作用，并提示：(a)或者ASA或者其它抗血小板药物治疗的病人通过与aPC联合治疗将获得增高的疗效，和(b)在存在抗血小板治疗情况下，可以减少aPC的治疗剂量。

表1

在豚鼠动静脉短路模型中ASA对血小板血栓烷B2释放和血栓重量的影响。该资料表明，尽管ASA几乎最大程度抑制血栓烷B2释放，但是对血栓重量无影响。

治疗	血栓烷B2释放	血栓重量
对照(PBS)	638ng/ml	38.3 ± 1.1mg (n=10)
ASA (10mg/kg)	10ng/ml	36.4 ± 1.3mg (n=8)

5

表2

aPC而非肝素和ASA之间抗血栓形成的协同作用。

治疗	血栓重量* (减ASA)	血栓重量* (加ASA)
对照	100 ± 3	95 ± 3
aPC	46 ± 5	27 ± 5 (P=0.01)
肝素	43 ± 5	39 ± 6

* 对照的%

10

实施例2

aPC和Iib/IIIa拮抗剂在豚鼠动静脉短路的血栓形成模型中的作用

15

为了检测aPC和典型的合成Iib/IIIa受体抗剂联合治疗的作用，采用实施例1中所述豚鼠AV短路的血栓形成模型。采用按Fisher等，美国专利第5,618,843号所述制备的2-([6-羧基-n-己基]甲酰胺基(carboxamidyl))-5-咪基苯并咪喃三氟乙酸盐。aPC和Iib/IIIa拮抗剂的联合使得抑制血栓形成显著强于单独用aPC所观察到的作用(表3)。这些资料证实了aPC和合成Iib/IIIa拮抗剂之间的协同作用。

表3

aPC和IIb/IIIa拮抗剂之间抗血栓形成的协同作用。

治疗	血栓重量* (减IIb/IIIa拮抗剂)	血栓重量* (加IIb/IIIa拮抗剂)
对照	100 ± 3	82 ± 3
aPC	46 ± 5	9 ± 1

* 对照的%

5

实施例3

aPC和abciximab在治疗血栓形成性疾病中的作用

abciximab (ReoPro[®]) 是一种通过结合至血小板细胞表面的IIb/IIIa受体而抑制血小板聚集的药物。aPC和abciximab的联合治疗在通过负调节血液凝固过程和抑制血小板聚集从而抑制血栓形成中是有效的。

10

Abiciximab以约0.05mg/kg至约1.0mg/kg药物团注射给予，接着以约0.025 μ g/kg/min至约1 μ g/kg/min持续静脉输注12小时。aPC作为药物团注射给予，然后持续静脉输注或者以约2 μ g/kg/hr至约96 μ g/kg/hr持续静脉输注约24至约144小时给予。

15

所述联合治疗产生一种协同作用，该联合治疗更安全更有效，并减少治疗血栓形成性疾病所必需的aPC和abciximab的剂量。