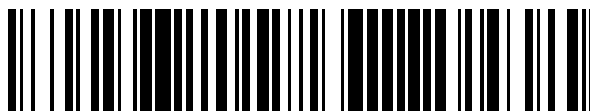


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 717**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2003 E 06023943 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1860118**

54 Título: **Método para producir una proteína de fusión de glucoproteína vi-Fc**

30 Prioridad:

07.06.2002 EP 02012742

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.01.2015

73 Titular/es:

**ADVANCECOR GMBH (100.0%)
Fraunhoferstrasse 17
82152 Martinsried, DE**

72 Inventor/es:

**MASSBERG, STEFFEN;
GAWAZ, MEINRAD;
UNGERER, MARTIN;
BÜLTMANN, ANDREAS;
MÜNCH, GÖTZ y
PELUSO, MARIO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 717 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir una proteína de fusión de glucoproteína vi-Fc

- 5 La presente invención se refiere a un método para obtener una proteína de fusión de Fc-GPVI-nt soluble que comprende una secuencia de aminoácidos de la Fig. 7.

Los síndromes coronarios o carotídeos agudos son una de las principales causas de muerte en las sociedades occidentales. Incluso en caso de supervivencia a dicho suceso cardiovascular, muchos pacientes padecen complicaciones que amenazan la vida, tales como trombosis intravascular, que conducen a posteriores infartos de miocardio o ictus.

La trombosis intravascular es el resultado de la agregación plaquetaria en un vaso por lo que el flujo sanguíneo en el vaso puede verse seriamente reducido o incluso inhibirse por completo. Específicamente, la rotura de una placa aterosclerótica inicia una cascada de sucesos que culminan en trombosis arterial e isquemia del tejido aguas abajo, precipitando enfermedades tales como el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular isquémico. La primera respuesta al daño vascular es la adhesión de plaquetas circulantes a las proteínas expuestas de la matriz subendotelial, lo que desencadena posteriormente la agregación plaquetaria. Entre los componentes macromoleculares de la capa subendotelial, el colágeno fibrilar está considerado el constituyente más trombogénico, ya que actúa como un fuerte activador de las plaquetas y mantiene la adhesión de las plaquetas tanto *in vitro* como *in vivo* (1-3).

La proteínas de la membrana de las plaquetas, que se ha comunicado que son receptores de colágeno putativos, pueden dividirse en las que interactúan indirectamente con colágeno a través de factor de von Willebrand unido a colágeno (vWf), que incluye GPIIb y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y las que interactúan directamente con colágeno que incluyen GPVI, la integrina $\alpha_2\beta_1$, y CD36 (revisado en (2)). Solo recientemente, se ha identificado a la glucoproteína de plaquetas VI (GPVI) como el principal receptor de colágeno en plaquetas (4). GPVI es una glucoproteína transmembrana de tipo I de 60-65 kDa, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (5;6). En plaquetas humanas y de ratón, GPVI forma un complejo con la cadena γ de FcR en la superficie celular (7;8). La unión del ligando a GPVI desencadena la fosforilación de tirosina del motivo ITAM de la cadena γ del receptor Fc iniciando la señalización aguas abajo por medio de las cinasas Syk, LAT, SLP-76, y fosfolipasa C (9-13). Las plaquetas deficientes en GPVI muestran una pérdida de adhesión y agregación inducida por colágeno *in vitro* (4; 14). Del mismo modo, los anticuerpos monoclonales anti-GPVI que bloquean la función atenúan la agregación plaquetaria *ex vivo* en respuesta al colágeno y al péptido relacionado con colágeno CRP, que imita a la triple hélice del colágeno (15;16).

Se sabe que el problema de las complicaciones debidas a la agregación de las plaquetas puede abordarse administrando inhibidores de la agregación plaquetaria. Para el tratamiento de los síndromes coronarios agudos, los inhibidores de GP IIb/IIIa tales como el ReoPro mejoran significativamente el desenlace de los pacientes. Sin embargo, un metaanálisis reciente de ensayos clínicos reveló un riesgo remanente significativo de muerte o infarto de miocardio a pesar de una intervención antitrombótica óptima (Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Theroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. Lancet 2002; 359:189-98). Los efectos secundarios de este régimen terapéutico son complicaciones de sangrado. Estas ocurrieron en el 2,4 % de los pacientes ocurriendo la forma más grave de sangrado intracraneal en aproximadamente el 0,1 % de los pacientes tratados. Se ha puesto de manifiesto que varias deficiencias mecánicas del bloqueo de los receptores GP IIb / IIIa explican la efectividad y los efectos secundarios subóptimos (Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engel-mann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. Thromb Res. 2001;101:53-64. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. Circulation. 1999;99:E1-E11).

La inhibición de la agregación plaquetaria conduce a un deterioro general de las plaquetas respecto de su capacidad para agregarse. Por consiguiente, no solo se influencia la formación de trombosis no deseada, sino también la capacidad general de las plaquetas para frenar el sangrado. Por lo tanto, la administración de inhibidores de la agregación plaquetaria conduce inherentemente a graves efectos secundarios, tales como sangrados, que pueden causar complicaciones potencialmente mortales adicionales. Por supuesto, estos efectos secundarios son más problemáticos en pacientes que padecen diabetes.

La diabetes es uno de los principales factores de riesgo para la aterosclerosis. La diabetes constituye además un riesgo aumentado de complicaciones potencialmente mortales y un exceso de morbilidad en pacientes que presentan síndromes vasculares y especialmente coronarios agudos. Los pacientes diabéticos con angina inestable presentan una mayor incidencia de ulceración de la placa y de trombosis intracoronaria en comparación con pacientes no diabéticos. (Biondo-Zoccai GGL; Abbate A; Liuzzo G, Biasucci L: Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. J Am Coll Cardiol 41; 1071-1077; 2003).

Cada vez se reconoce más que las plaquetas son un activador principal para la progresión de la aterosclerosis. La relación entre el aumento de la ateroprogresión y la respuesta aumentada de las plaquetas y la diabetes es hasta ahora un problema sin resolver. Los pacientes diabéticos padecen complicaciones vasculares agudas independientes del grado de aterosclerosis, lo que es indicativo de diferentes mecanismos actualmente desconocidos de activación de plaquetas en el desarrollo de complicaciones vasculares agudas diabéticas y complicaciones vasculares agudas ateroscleróticas.

Por lo tanto, el problema de la invención es proporcionar un método para obtener un medicamento que sea útil para evitar complicaciones potencialmente mortales posteriores a un síndrome coronario o carotídeo agudo a la vez que se mantiene la potencia homeostática de la sangre.

Es un problema adicional de la presente invención proporcionar un método para obtener un medicamento para el tratamiento o prevención de la ateroprogresión.

También es un problema de la invención proporcionar un método para obtener un medicamento para el tratamiento de la diabetes, en particular para las complicaciones asociadas con diabetes.

Descripción general de la invención

Los problemas anteriores se resuelven de acuerdo con las reivindicaciones. La presente invención proporciona la primera prueba *in vivo* directa que indica que GPVI es de hecho estrictamente necesaria en el proceso de reclutamiento de plaquetas sometidas a estrés de corte después de una lesión vascular. En distintos modelos murinos de denudación endotelial tanto la inhibición como la ausencia de GPVI anuló virtualmente las interacciones entre plaquetas-pared del vaso y la agregación plaquetaria, lo que identifica a GPVI como el determinante principal de la formación de trombos arteriales. Esto indica que la inhibición de las interacciones GPVI-ligando impiden la trombosis arterial en el establecimiento de la aterosclerosis. La presente invención usa el potencial antitrombótico de una forma específica soluble de GPVI. Específicamente, se proporciona un proceso para obtener una proteína de fusión, que contiene el dominio extracelular de GPVI y un marcador del extremo N terminal de Fc humano. La forma soluble de GPVI humano se une específicamente al colágeno con una alta afinidad y atenuó la adhesión plaquetaria a colágeno inmovilizado *in vitro* y a sitios de lesión vascular *in vivo*. Por consiguiente, la presente invención se basa en reconocer que la condición previa para la trombosis intraarterial como una complicación clínica aguda es la adhesión inicial de las plaquetas a lesiones activas en las paredes de los vasos. Los presentes inventores han acreditado que la adhesión plaquetaria a colágeno de la matriz subendotelial en una lesión de la pared vascular mediante el receptor de glucoproteína VI (GPVI) representa el evento clave para la formación de la trombosis. La inhibición de la adhesión de las plaquetas al colágeno de la matriz subendotelial de la proteína de fusión obtenida por la invención es por lo tanto capaz no solamente de prevenir la adhesión de las plaquetas a una lesión activa, sino también de prevenir la agregación de las plaquetas a la lesión activa. De este modo, la formación de trombosis intravascular puede evitarse de manera eficaz sin deteriorar la capacidad general de agregación de las plaquetas.

Es sorprendente que el complejo proceso de la formación de la trombosis pueda inhibirse mediante la inhibición de un solo receptor de las plaquetas a la vista del hecho de que los distintos componentes de las capas subendoteliales son ligandos y activadores de las plaquetas, tales como laminina, fibronectina, factor de von Willebrand (vWf) y colágeno. Además, se ha propuesto una amplia variedad de receptores en las plaquetas mediante exámenes *in vitro*, pero el receptor o las combinaciones de receptores relevantes que influyen en la adhesión de las plaquetas a las lesiones *in vivo* no se conocía anteriormente.

La presente invención también se basa en reconocer que GP VI es un medidor principal de la actividad de las plaquetas para la progresión de la aterosclerosis. Se ha demostrado que la inhibición de la activación de GPVI mediada por colágeno atenúa la ateroprogresión en ratones Apo e *-/-* propensos a la aterosclerosis (véase la figura 16). Además, se ha demostrado que las plaquetas de los pacientes diabéticos, que también son propensos a la aterosclerosis avanzada y al aumento de las complicaciones trombóticas muestran una expresión aumentada del receptor de Fc correceptor de GPVI. Por lo tanto, las plaquetas de los diabéticos pueden mostrar una respuesta aumentada a la estimulación con colágeno que conduce al aumento de las complicaciones trombóticas observadas clínicamente en la angina inestable, donde el colágeno se descubre de las capas vasculares subendoteliales por ruptura de la placa o denudación endotelial.

La invención proporciona un método para obtener un medicamento para el tratamiento de las complicaciones vasculares agudas tales como la trombosis intravascular especialmente en pacientes con diabetes. La inmunoconjugación Fc-GPVI-nt es una potente herramienta terapéutica para atenuar la ateroprogresión y la respuesta aumentada de las plaquetas al colágeno por medio del receptor GPVI. Por lo tanto, Fc-GPVI-nt es un medicamento para el tratamiento de la aterosclerosis y particularmente para el tratamiento de las complicaciones ateroscleróticas de la diabetes.

Esta invención proporciona un método para obtener una proteína de fusión soluble (Fc-GPVI-nt) que comprende los siguientes segmentos:

- (a) el dominio extracelular de la glucoproteína VI (GP VI) y
- (b) el dominio Fc de una inmunoglobulina,

en el que la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 7 y el método comprende expresar la proteína de fusión en células HELA usando un sistema de expresión adenoviral. La proteína de fusión se obtiene preferentemente

- (a) recogiendo 2 días después de la infección el sobrenadante del cultivo de células Hela infectadas con un adenovirus para Fc-GPVI-nt que codifica una secuencia de aminoácidos como se muestra en la figura 7;
- (b) centrifugando (3800 g, 30 min, 4°C) el sobrenadante de la etapa (a);
- (c) filtrando (0,45 µm) el sobrenadante de la etapa (b);
- (d) precipitando la inmunoadhesina por adición de 1 vol. de sulfato de amonio (761 g/l) y agitando durante toda la noche a 4°C;
- (e) precipitando las proteínas por centrifugación (3000 g, 30 min, 4°C),
- (f) disolviendo las proteínas precipitadas de la etapa (e) en 0,1 Vol de PBS y dializando en PBS durante toda la noche a 4°C;
- (g) aclarando la solución de proteínas por centrifugación (3000 g, 30 min, 4°C);
- (h) cargando la solución de la etapa (g) en una columna de proteína A (HiTrap™ protein A HP, Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suecia); (i) lavando la columna con tampón de unión (tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,0, NaN₃ al 0,02 %) hasta DO₂₈₀ < 0,01;
- (k) eluyendo las fracciones con tampón de elución (glicina 100 mM a pH 2,7);
- (l) neutralizando las fracciones eluidas con tampón de neutralización (Tris/HCl 1 M a pH 9,0, NaN₃ al 0,02 %);
- (m) agrupando las fracciones;
- (n) dializando las fracciones agrupadas en PBS durante toda la noche a 4 °C,
- (o) preparando alícuotas del producto dializado y congelando a -20 °C.

En las condiciones anteriores, se obtiene la proteína de fusión como un dímero unido covalentemente de una masa molecular de 160 kDa medida en condiciones no reductoras mediante SDS-PAGE. La dimerización de la proteína de fusión sucede presumiblemente mediante puentes disulfuro intercatenarios de cisteínas en un dominio específico adyacente al fragmento GPVI de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 7. La naturaleza dimérica de la proteína de fusión depende al menos de la presencia de una región específica entre la porción Fc y la porción GPVI como está contenido en la Figura 7, y del proceso de preparación. Una proteína monomérica de fusión no es útil como agente terapéutico en la práctica ya que las propiedades inferiores de unión de una proteína monomérica de fusión en comparación con la proteína dimérica de fusión harían necesaria la administración de una cantidad de proteína que es un orden de magnitud mayor que la cantidad de la proteína dimérica de fusión para obtener un efecto similar. cf. Figura 9(e). La administración de grandes cantidades de proteínas es, sin embargo, problemática desde un punto de vista terapéutico y económico, en particular en el tratamiento de enfermedades crónicas.

La proteína de fusión obtenida mediante la invención es una inmunoadhesina. Tiene un segmento (a) que tiene la función del dominio extracelular del GPVI de las plaquetas.

El segmento (b) de dicha proteína de fusión sirve para al menos uno de los siguientes fines: secreción de la proteína de fusión de las células que producen dicha proteína de fusión, proporcionar el segmento (a) en una forma

(p.ej., plegamiento o estado de agregación) funcional para unirse al colágeno, para purificación por afinidad de dicha proteína de fusión, para reconocimiento de la proteína de fusión por un anticuerpo, proporcionando propiedades favorables a la proteína de fusión cuando se usa como un medicamento. Sorprendentemente y de manera más importante, el segmento (b) permite la producción de dicha proteína de fusión en células de mamíferos, preferentemente humanas, y la secreción al sobrenadante de las células en forma activa, es decir, en una forma funcional para unirse al colágeno. El segmento (b) es un dominio Fc de una inmunoglobulina.

Los segmentos (a) y (b) de la proteína de fusión de la invención están unidos por un enlazador.

La invención proporciona además un método para obtener un medicamento para la prevención o tratamiento de la trombosis intraarterial, que contiene una proteína que comprende el dominio extracelular de la glucoproteína VI. Dicha proteína es dicha proteína de fusión obtenida mediante la invención. Si dicho medicamento contiene dicha proteína de fusión, dicho medicamento preferentemente comprende además un vehículo adecuado. Dicho medicamento se administra preferentemente por vía parenteral, más preferentemente, se administra por vía intravenosa. Como han descubierto los presentes inventores, las interacciones GPVI-colágeno son el factor principal de adhesión de las plaquetas a una pared de un vaso lesionado. La proteína de fusión obtenida mediante la invención puede prevenir la unión de las plaquetas al colágeno expuesto a la sangre en el sistema vascular bloqueando dicho colágeno expuesto a sangre sin inhibir otras funciones de las plaquetas.

Descripción de las figuras

Figura 1 Adhesión y agregación de las plaquetas después de lesión vascular de la arteria carótida común en ratones C57BL6/J *in vivo*, (a) Micrografías de microscopio electrónico de barrido de las arterias carótidas antes de (paneles de la izquierda) y 2 h después (paneles de la derecha) de la lesión vascular. La denudación endotelial induce la adhesión y agregación plaquetaria, dando como resultado la formación de un trombo rico en plaquetas (parte inferior izquierda), (fa) las interacciones plaqueta-célula endotelial 5 minutos después de la lesión vascular se investigaron mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* de la arteria carótida común *in situ* (columnas negras). Los animales sin lesión vascular sirvieron como controles (columnas abiertas). Los paneles izquierdo y derecho resumen la adhesión transitoria y firme de plaquetas, respectivamente, de ocho experimentos por grupo. Las plaquetas se clasificaron de acuerdo con su interacción con el linaje celular endotelial como se ha descrito²⁴ y se proporcionan por mm² de superficie del vaso. Media $\pm$ d.t.m, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el control, $P < 0,05$. (c) La agregación plaquetaria después de la lesión vascular se determinó por microscopía de fluorescencia *in vivo* (columnas negras). Los animales sin lesión vascular sirvieron como controles (columnas abiertas). Media $\pm$ d.t.m, n=8 cada grupo, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con los ratones de tipo silvestre, $P < 0,05$. Las microfotografías (derecha) muestran imágenes representativas de microscopía de fluorescencia *in vivo* en animales de control (panel superior) o después de lesión vascular (panel inferior). Las flechas blancas indican las plaquetas adherentes.

Figura 2 La inhibición de GPVI anula la adhesión y agregación plaquetaria después de lesión vascular, (a) La adhesión plaquetaria después de la lesión vascular se determinó por microscopía de videofluorescencia intravital. Las plaquetas fluorescentes se preincubaron con 50 pg/ml de fragmentos Fab de anti-GPVI (JAQ1) o IgG de rata de control. Las plaquetas sin preincubación con AcM sirvieron como control. Los paneles izquierdo y derecho resumen la adhesión transitoria y firme de plaquetas, respectivamente. Media $\pm$ d.t.m, n=8 cada grupo, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el control, $P < 0,05$. (b) ilustra el porcentaje de plaquetas que establecen la adhesión irreversible después que se produzca el anclaje inicial/traslación lenta de superficie. (c) Agregación plaquetaria después de lesión vascular *in vivo*. La agregación de plaquetas preincubadas con tirodos, IgG de rata irrelevante, o Fab anti-GPVI (JAQ1) se evaluó por microscopía de fluorescencia como se ha descrito. Media $\pm$ d.t.m, n=8 cada grupo, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el control, $P < 0,05$. (d) Las fotomicrografías muestran imágenes de microscopía *in vivo* representativas que ilustran la adhesión de las plaquetas en ausencia o presencia de Fab anti-GPVI Fab (JAQ1) o IgG de control.

Figura 3 Adhesión de las plaquetas después de la denudación endotelial en ratones deficientes en GPVI. **(a)** Los ratones tratados con JAQ1 carecen de GPVI. *Paneles superiores:* Las plaquetas de los ratones pretratados con IgG de control irrelevante (izquierda) o anti-GPVI (JAQ1) (derecha) se incubaron con JAQ1 marcado con FITC y CD41 anti-ratón marcado con PE durante 10 minutos a temperatura ambiente y se analizaron directamente en un dispositivo FACScan™. Se presenta una transferencia por puntos de 3 ratones por grupo representativa. *Panel inferior:* Los lisados de plaquetas completas de tres ratones tratados con IgG de control o JAQ1 se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se inmunotransfirieron con JAQ1 marcado con FITC, seguido por una incubación con AcM de conejo anti-FITC marcado con HRP. **(b)** Micrografías electrónicas de barrido de arterias carótidas 2 horas después de la lesión vascular en animales de control (paneles superiores) o ratones con empobrecimiento de GPVI (paneles inferiores). La denudación endotelial indujo la adhesión de plaquetas y la agregación plaquetaria en animales de control. Por el contrario, solo se unieron muy pocas plaquetas a lo largo la pared del vaso dañado en los ratones con empobrecimiento de GPVI. Las fibras de colágeno subendotelial son visibles a lo largo del área denudada. **(c)** Anclaje de las plaquetas y adhesión firme de las plaquetas, **(d)** transición del anclaje inicial a la captura estable (porcentaje de plaquetas ancladas), y **(e)** agregación de las plaquetas después de la lesión vascular de la arteria carótida se determinó en los ratones deficientes en GPVI (ratones pretratados con JAQ1) o pretratados con IgG de control (para más detalles véase Materiales y Métodos). Los paneles resumen la adhesión de plaquetas (transitoria y firme) y la agregación plaquetaria en ocho experimentos por grupo. Media $\pm$ d.t.m, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con la IgG control, $P < 0,05$. **(f)** Las fotomicrografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia *in vivo* que ilustran la adhesión de las plaquetas en ratones deficientes en GPVI (JAQ1) y tratados con IgG de control.

Figura 4 Se determinó la adhesión plaquetaria a la superficie de cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágeno en condiciones de flujo fisiológico *ex vivo*. *Panel izquierdo:* Se investigó la adhesión en condiciones de flujo biológico de plaquetas de ratones tratados con inmunoadhesinas de IgG irrelevante de control (control) (izquierda) o inmunoadhesina anti-GPVI (Fc-GP VI-nt) (derecha). El número de plaquetas se evaluó mediante recuento en FACS de los cubreobjetos lavados al final de cada experimento. Se determinó el anclaje de las plaquetas como la primera etapa de la adhesión plaquetaria después de 30 segundos y la adhesión firme de plaquetas después de 5 minutos en condiciones de flujo. (Para más detalles véase el Ejemplo 6). Los paneles resumen la adhesión transitoria y firme de las plaquetas en ocho experimentos por grupo. Media $\pm$ d.t.m, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con la IgG control, $P < 0,05$.

Figura 5 La interacción de Fc-GPVI-nt con colágeno se controló en un ensayo basado en ELISA. Se investigó la adhesión de la inmunoadhesina Fc-GPVI-nt consistente en el dominio extracelular de GPVI y la parte FC de una IgG a placas recubiertas con colágeno con concentraciones en aumento de Fc-GPVI-nt (de 0,5 µg a 10 µg). La unión se visualiza con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa dirigido a la parte Fc de Fc-GPVI-nt. La peroxidasa se detecta finalmente mediante ELISA. En este experimento representativo se controló la unión de Fc-GPVI-nt a colágeno con suficiente afinidad, que alcanzó la saturación a concentraciones de mg.

Figura 6 Interacción de la Fc-GPVI-nt con colágeno y la posibilidad de explorar inhibidores de GPVI se demostró con el anticuerpo JAQ1 anti-GPVI de ratón. Se demuestra que la adhesión de la inmunoadhesina Fc-GPVI-nt (2 µg/pocillo) a placas de ELISA recubiertas con colágeno es específica: las de inmunoadhesina Fc-nt vacíos no mostraron ninguna unión. Por lo tanto, esto proporciona un ensayo basado en ELISA para la exploración de inhibidores de GPVI con el potencial de ampliación de escala a capacidades de alto rendimiento.

Figura 7 Secuencia de aminoácidos de Fc-GPVI-nt: SEC ID N°: 1.

Figura 8 Secuencia de ADN de inmunoadhesina Fc-GPVI-nt: SEC ID N°: 2. Las bases 1 a 807 codifican el dominio extracelular de GPVI. Las bases 817 a 1515 codifican la parte Fc de la IgG.

Figura 9 Caracterización de GPVI-Fc. **(a) panel superior:** Se usaron Fc-GPVI-nt y Fc de control que carece del dominio extracelular d GPVI para SDS-PAGE en condiciones reductoras. La tinción con azul de coomasie (izquierda) y la inmunotransferencia con anticuerpo Fc de cabra anti-humano conjugado a peroxidasa (derecha) identificaron a Fc-GPVI-nt con una masa molecular de ~80 kDa. **Panel medio:** Inmunotransferencia de Fc, Fc-GPVI-nt, o plaquetas humanas usando el anticuerpo monoclonal 5C4 anti-GPVI. 5C4 detectó tanto proteína de fusión Fc-GPVI-nt expresada mediante adenovirus como GPVI de plaquetas, pero no la Fc de control. **Panel inferior:** Masa molecular en condiciones reductoras (derecha) y no reductoras (izquierda). Mientras que la masa molecular de Gc-GPVI-nt fue aproximadamente 80 kDa en condiciones reductoras, la proteína nt completa con ~160 kDa se identificó en condiciones no reductoras. **(b-d)** Caracterización de interacciones de Fc-GPVI-nt con colágeno. **(b)** Se efectuaron ensayos de unión usando diferentes concentraciones de Fc-GPVI-nt soluble y colágeno inmovilizado (10 µg/ml) para definir interacciones Fc-GPVI-nt-colágeno. Se detectó Fc-GPVI-nt unido mediante anticuerpo AcM anti-Fc (dilución 1:10.000) y se proporciona en relación a la unión observada a 10 µg/ml de Fc-GPVI-nt. Fc-GPVI-nt se une a colágeno de manera saturable. Media ± d.t.m, n = 6 por cada concentración de Fc-GPVI-nt, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con 0 mg/ml de Fc-GPVI-nt, P < 0,05. **(c, panel izquierdo)** muestra la unión de Fc-GPVI-nt (20 µg/ml) a varios sustratos. La unión de Fc-GPVI-nt a BSA (10 µg/ml) o vWF (10 µg/ml) se proporciona como porcentaje de unión de dímero de GPVI a colágeno inmovilizado. No sucedió unión de Fc-GPVI-nt a BSA o vWF, lo que apoya la especificidad de la unión de Fc-GPVI-nt. Media ± d.t.m, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el colágeno, P < 0,05. **(c, panel derecho)** ilustra la unión de Fc-GPVI-nt (20 µg/ml) o Fc (20 µg/ml) a colágeno inmovilizado (10 µg/ml). Se detectó Fc-GPVI-nt o Fc unido mediante anticuerpo AcM anti-Fc (dilución 1:10.000) y se proporciona en relación a la unión observada con Fc-GPVI-nt. Solo Fc-GPVI-nt, pero no Fc o AcM anti-Fc se une a colágeno inmovilizado. Media ± d.t.m, n=8 cada grupo, el asterisco indica una diferencia significativa en comparación con la unión de Fc-GPVI-nt, P < 0,05. **(d)** Se preincubó Fc-GPVI-nt (20 µg/ml) durante 10 minutos con diferentes concentraciones de colágeno soluble. Después de la incubación se lavó las placas y se detectó la unión de Fc-GPVI-nt mediante anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado a peroxidasa (dilución 1:10.000). La unión de Fc-GPVI-nt se proporciona en relación a la unión observada en ausencia de colágeno soluble. El colágeno soluble inhibe la unión dímero-dímero de GPVI-Fc a colágeno inmovilizado de manera dependiente de la dosis. Media ± d.t.m, n = 3 por cada concentración de colágeno, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con 0 mg/ml de colágeno, P < 0,05. **(e)** Se determinó la diferencia de la afinidad de unión entre la forma monomérica de la proteína de fusión GPVI-Fc y Fc-GPVI-nt en comparación directa. La unión del monómero y dímero se determinó sobre placas de ELISA recubiertas con colágeno tipo 1. Concentraciones en aumento de proteínas de fusión de GPVI unidas a colágeno de manera saturable. Aquí se muestra una representación de Lineweaver Burke para la determinación de la afinidad (e). La afinidad de la proteína de fusión de GPVI monomérica fue de aproximadamente 10 veces en comparación con concentraciones equimolares de la forma dimérica Fc-GPVI-nt.

Figura 10 Fc-GPVI-nt inhibe la activación de CD 62 P en plaquetas humanas como un parámetro de liberación de sustancias transmisoras intracelulares desde gránulos alfa mediante dosis en aumento de colágeno. Las plaquetas humanas se aislaron de sangre completa y se incubaron con anticuerpos anti-CD 62 marcados con PE (para más detalles véase Materiales y Métodos). La fluorescencia se determinó en un dispositivo FACS de Becton Dickenson. Se muestran histogramas representativos. Las concentraciones en aumento de colágeno desde 0 hasta 10 µg/ml indujeron un cambio de la fluorescencia en presenecia de la proteína Fc de control (100 µg/ml; línea azul). En presencia de Fc-GPVI-nt (100 µg/ml; línea roja), el cambio de fluorescencia y por lo tanto de activación de CD 62 P se inhibió de manera destacable.

Figura 11 Inhibición específica de agregación de plaquetas mediada por colágeno y liberación de transmisores endógenos desde gránulos densos y alfa mediante Fc-GPVI-nt. **(a)** Se incubaron plaquetas humanas con Fc de control (80 µg/ml) o Fc-GPVI-nt (80 µg/ml). La agregación de las plaquetas se indujo con colágeno (1 µg/ml) o

ADP (5 μ M) o TRAP (10 μ M) y se determinó la agregación en un agregómetro en condiciones de agitación (para más detalles véase Materiales y Métodos). Se efectuaron medidas por triplicado a partir de $n = 5$ donantes de sangre diferentes. Las medias $\pm$ d.t.m se proporcionan en % de agregación de la agregación de control sin proteínas de fusión. **(b)** La liberación de ATP se midió simultáneamente en las mismas sondas después de la incubación con Fc de control (80 μ g/ml) o Fc-GPVI-nt (80 μ g/ml). La cantidad de liberación de ATP se proporciona en % de los controles sin proteína de fusión. **(c)** La liberación de PDGF se determinó en plaquetas humanas con un sistema ELISA específico para PDGF humano en condiciones basales y después de la estimulación por colágeno (20 μ g/ml) (para detalles adicionales véase Materiales y Métodos). La preincubación con Fc de control no tuvo un efecto significativo en la liberación de PDGF por plaquetas estimuladas con colágeno, mientras que Fc-GPVI-nt (100 μ g/ml) redujo la liberación de PDGF de manera significativa. La inhibición de la liberación de PDGF no sucedió en plaquetas no estimuladas.

Figura 12 Fc-GPVI-nt no tiene efecto significativo en el tiempo de sangrado en sangre de humano *ex vivo*. El tiempo de sangrado en sangre humana se midió *ex vivo* después de estimulación con ADP/colágeno y estimulación con epinefrina/colágeno en un dispositivo PFA-100. Fc-GPVI-nt (5 y 20 μ g/ml) y Fc (5 y 20 μ g/ml) no prolongaron el tiempo de sangrado mientras que ReoPro^R en concentración terapéuticamente relevante (5 μ g/ml) prolongó de manera máxima el tiempo de sangrado en ambas condiciones. Se resumen las medias $\pm$ d.t.m de $n = 4$ donantes de sangre con medidas por triplicado.

Figura 13 Fc-GPVI-nt inhibe la adhesión de plaquetas a colágeno inmovilizado en condiciones de flujo. Se aislaron plaquetas humanas (2×10^8 células/ml) a partir de sangre completa (para detalles adicionales véase Materiales y Métodos). Se recubrieron las placas con colágeno inmovilizado (10 μ g/ml) o vWF (10 μ g/ml). La adhesión de las plaquetas a las placas recubiertas se determinó en una cámara de flujo de cámara paralela en presencia de Fc-GPVI-nt o Fc que carece del dominio GPVI extracelular (200 μ g/ml). La inhibición de la adhesión de plaquetas por Fc-GPVI-nt se proporciona en % del control (control de Fc). Fc-GPVI-nt atenuó de manera significativa la adhesión de plaquetas sobre colágeno inmovilizado a velocidades de cizalladura de 500 s^{-1} y 100 s^{-1} , respectivamente. Por el contrario, Fc-GPVI-NT no afectó a la adhesión de las plaquetas en vWF inmovilizado. Media $\pm$ d.t.m, $n=4$ cada grupo, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el Fc control, $P < 0,05$. Los paneles inferiores muestran imágenes microscópicas representativas.

Figura 14 Fc-GPVI-nt tiene una farmacocinética favorable con una semivida en plasma prolongada después de inyección intraperitoneal a ratones *in vivo*. Las concentraciones en sangre de Fc-GPVI-nt se determinaron con anticuerpos anti-Fc específicos y ELISA (para más detalles véase Materiales y métodos). **(a)** Una sola inyección intraperitoneal de Fc-GPVI-nt (4 μ g/g) condujo a picos de concentración rápidos en sangre de Fc-GPVI-nt después de ~ 24 h con una disminución lenta de concentraciones en sangre de Fc-GPVI-nt. Se muestran las medias $\pm$ d.t.m procedentes de 10 animales. **(b)** Las aplicaciones intraperitoneales repetidas (10 μ g/g; dos veces a la semana) conducen a una acumulación continua de Fc-GPVI-nt en ratones *in vivo* a lo largo de 28 días. Se muestran las medias $\pm$ d.t.m procedentes de 6 animales. **(c)** Una inyección monodosis intravenosa de 30 μ g de Fc-GPVI-nt (1 μ g/g de peso corporal); 60 μ g (2 μ g/g peso corporal) y 100 μ g de Fc-GPVI-nt (3 μ g/g de peso corporal) por ratón condujo a un aumento dependiente de la dosis de concentración en plasma de inmunoadhesina. La concentración en plasma en las dos concentraciones mayores en estos ratones *in vivo* alcanzó niveles elevados prolongados a partir de los 5 a 60 minutos y después de 24 horas, suficiente para la captación efectiva de colágeno y por lo tanto para una inhibición efectiva de la activación del receptor de GPVI en las plaquetas. Se muestran las medias $\pm$ d.t.m procedentes de 5 animales.

Figura 15 Efectos de Fc-GPVI-nt en la adhesión y agregación plaquetaria *in vivo*. **(a)** Se trató a los ratones ($n=6$ por grupo) con 2 mg/kg o 4 mg/kg de Fc-GPVI-nt iv. Los ratones tratados con integrilina (0,2 mg/kg) sirvieron como controles positivos ($n=8$). Se determinaron los tiempos de sangrado del modo descrito (véase Materiales y métodos). La proteína de fusión de Fc-GPVI-nt no aumentó los tiempos de sangrado de la vena caudal en comparación con animales de control. El tiempo de sangrado de la vena caudal de los ratones tratados con integrilina aumentó de manera masiva. $**P < 0.05$ frente a control. **(b)** La inhibición de GPVI anula la adhesión y agregación plaquetaria después de lesión vascular. Se determinó la adhesión plaquetaria después de lesión vascular mediante microscopía de videofluorescencia intravital. Los ratones se pretataron con 1 o 2mg/kg de Fc-GPVI-nt o con cantidades equimolares de Fc de control. Los paneles izquierdo y derecho resumen el anclaje de plaquetas y la adhesión firme de plaquetas, respectivamente. Media $\pm$ d.t.m, $n=5$ cada grupo, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el Fc, $P < 0,05$. **(c)** Efectos de Fc-GPVI-nt en la formación de trombos después de lesión vascular *in vivo*. Se determinaron el número de trombos de plaquetas (derecha) y el área total de los trombos (izquierda) mediante microscopía de fluorescencia del modo descrito. Media $\pm$ d.t.m, $n=5$ cada grupo, el asterisco indica diferencia significativa en comparación con el Fc, $P < 0,05$. **(d)** Las fotomicrografías muestran imágenes representativas de microscopía de fluorescencia *in vivo* que ilustran la adhesión plaquetaria en ausencia o presencia de 1 o 2 mg/kg de Fc-GPVI-nt o Fc de control. Las barras representan 50 μ m. **(e)** Micrografías electrónicas de barrido de arterias carótidas 1 hora después de lesión vascular en animales tratados con Fc o con Fc-GPVI-nt. La denudación endotelial indujo la adhesión plaquetaria y la agregación plaquetaria en ratones tratados con Fc. Por el contrario, solo se unieron muy pocas plaquetas a lo largo la pared del vaso dañado en los ratones tratados con Fc-GPVI-nt. Las fibras de colágeno subendotelial son visibles a lo largo del área denudada. Las barras representan 10 μ m **(f)** Fc-GPVI-nt se une específicamente al subendotelio de las

arterias carótidas. Se determinó la unión de Fc-GPVI-nt al subendotelio en secciones de carótida, teñidas con anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugados a peroxidasa. Las arterias carótidas obtenidas de ratones tratados con Fc sirvieron como controles. Se detectó proteína Fc-GPVI-nt pero no Fc de control en el subendotelio, según se indica por la tinción de color marrón. Ampliación original: 100 veces.

Figura 16 Fc-GPVI-nt atenúa significativamente la ateroprogresión en ratones *knockout* para apo e *-/-* *in vivo*. Se trató a los ratones Apo e *-/-* con Fc-GPVI-nt (4 µg/g) o Fc de control (4 µg/g) por vía intraperitoneal durante 4 semanas dos veces a la semana. Se investigó la ateroprogresión *post mortem* después de la tinción con Sudán rojo de los grandes vasos para visualizar el ateroma y la formación de placa. En los animales de control la formación extensa de placa de preparaciones de arteria carótida se indicó por el color rojo, en particular en la región de ramificación. En los animales tratados con Fc-GPVI-nt la aterosclerosis fue eliminada prácticamente por completo en las arterias carótidas de ratones apo e *-/-*. Se muestran preparaciones vasculares completas macroscópicas representativas de las arterias carótidas de un ratón apo e *-/-* después de 4 semanas de tratamiento con Fc-GPVI-nt y de un ratón apo e *-/-* después de 4 semanas de tratamiento con la proteína Fc de control (lado derecho).

Figura 17 Las plaquetas recién aisladas de pacientes que padecen diabetes mellitus muestran expresión reducida del receptor de fibrinógeno (CD61, parte superior) y expresión aumentada del receptor de Fc (CD32, parte media) y por lo tanto expresión aumentada de GPVI. Se muestra la correlación entre expresión de CD32 y expresión de GPVI (detectada mediante el anticuerpo monoclonal específico 4C9) en plaquetas humanas (parte inferior). Se aislaron plaquetas humanas de sangre completa de pacientes que padecen diabetes y se incubaron con anticuerpos anti-CD61 y anti-CD32 o o anticuerpos 4C9 marcados con FITC fluorescentes. La fluorescencia se determinó en un dispositivo FAC-Scalibur de Becton Dickinson. Se resumen las medias $\pm$ d.t.m de n = 111 pacientes diabéticos y de n = 363 pacientes sin diabetes. Se calculó la correlación de la fluorescencia de CD32 y la fluorescencia de 4C9 con el coeficiente de correlación $r = 0,516$.

Figura 18 Secuencia de aminoácidos de una proteína monomérica de fusión basada en Fc-GPVI-nt.

Descripción detallada de la invención

Una hipótesis previa sugería que la unión de glucoproteína de plaquetas (GP) Ib a vWf recluta las plaquetas en el flujo a la pared de los vasos lesionados (Ruggeri, Z.M: Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemost.* 1997; 78, 611-616), mientras que los colágenos fibrilares subendoteliales soportan la adhesión firme y la activación de plaquetas (van Zanten, G.H. et al., Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin. Invest* 1994; 93, 615-632; Clemetson, K.J. y Clemetson, J.M. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 2001, 86, 189-197). Sin embargo, la presente invención demuestra mediante microscopía *in vivo* de la arteria carótida de ratón que la inhibición o ausencia del principal receptor de colágeno de las plaquetas, GPVI, en cambio, anula las interacciones plaqueta-pared del vaso después de una erosión endotelial. De manera inesperada, la inhibición de GPVI reduce el anclaje de plaquetas y la adhesión al subendotelio en aproximadamente un 89 %. Además, la captura estable y agregación de plaquetas se anula virtualmente en estas condiciones. La estricta necesidad de GPVI en estos procesos se confirmó en ratones deficientes en GPVI, donde las plaquetas también son incapaces de adherirse y agregarse en la pared vascular dañada. Estos descubrimientos revelan un papel inesperado de GPVI en la iniciación de la unión de plaquetas en sitios de lesión vascular e identifican unívocamente las interacciones plaqueta-colágeno como el determinante principal de las complicaciones ateroscleróticas inducidas por plaquetas.

Se ha descrito el hecho de que GPVI funciona generalmente como receptor para el colágeno de la matriz subendotelial (Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 1989; 84: 1440 - 1445). Estos autores caracterizaron plaquetas *in vitro* originadas en pacientes con una deficiencia en el receptor GPVI. Sin embargo, la significación fisiológica de la interacción de colágeno y receptor GPVI en el contexto *in vivo* y la contribución relativa del receptor GPVI a la adhesión después de la lesión vascular era desconocida. En particular, no se sabía que la inhibición de este receptor inhibe la etapa clave de la formación de trombosis intravascular que es el anclaje de plaquetas. La presente invención revela al receptor GPVI como un receptor esencial para la adhesión de plaquetas al subendotelio mediante la unión al colágeno de la matriz subendotelial *in vivo*. Entre la variedad de otras proteínas de superficie de las plaquetas, tales como GP Ib (receptor de von Willebrand), el receptor de $\alpha IIb\beta 3$ integrina, los receptores de $\alpha 2\beta 1$ integrina o de GP V, se ha identificado sorprendentemente que el receptor GPVI es un receptor esencial para mediar la adhesión plaquetaria a la pared vascular. Ya que la adhesión de las plaquetas es la primera y la más importante etapa para la agregación plaquetaria y la formación de trombos intraarteriales en condiciones de estrés de cizalla fisiológico, los siguientes efectos perjudiciales que conducen a la oclusión intraarterial son la base funcional para los síndromes clínicos de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. En una configuración crónica, la interacción de las plaquetas con el endotelio propaga etapas tempranas de la aterosclerosis. Nuestra invención también demostró por primera vez que el receptor GPVI juega un papel crucial entre la compleja variedad de varias proteínas de superficie de las plaquetas para la adhesión inicial de las plaquetas y para la interacción crónica de plaquetas-endotelio en la propagación de la aterosclerosis.

Los documentos WO 01/16321 y WO 01/00810 divulgan una secuencia de ADN y de proteína del receptor GPVI humano. Sin embargo, la significación de la adhesión plaquetaria y activación por medio de lesiones endoteliales no se ha demostrado en un fondo *in vivo*.

- 5 El documento US 6.383.779 divulga proteínas de fusión de GPVI. Sin embargo, esta referencia no divulga una proteína de fusión dimérica o cualquier efecto terapéutico de GPVI.

Jandrot-Perrus et al., Blood 96 (2000), 1798-1807 describe la clonación, caracterización y estudios funcionales de glucoproteína VI humana y de ratón.

- 10 Recientemente, se investigaron las diferentes etapas de la interacción plaqueta-colágeno a colágeno artificial *in vitro* durante condiciones de perfusión (Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tzomiyama Y, Ordinas A y Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. Blood 1997; 88: 2081-2092). Los autores de ese estudio ya señalaron la importancia de la
15 interacción colágeno-GPVI durante condiciones de estrés de cizalla. Sin embargo, la relevancia del colágeno de la matriz subendotelial para la adhesión no pudo estudiarse en esta situación artificial *in vitro*. A consecuencia de la limitada relevancia de su modelo *in vitro*, los autores del estudio anteriormente mencionado llegaron a la conclusión de que los receptores GPVI en cambio están implicados en la activación de plaquetas en vez de la adhesión de plaquetas al endotelio. Por el contrario, el receptor GP de von Willebrand está implicado de manera significativa en la
20 interacción plaqueta-subendotelio. Estos autores también enfocaron toda la información disponible acerca de la interacción plaqueta-colágeno en una revisión de la bibliografía actual. Anteriormente, Moroi M y Jung, SM (Platelet receptors for collagen. Thromb. Haemost. 1997; 78: 439-444) habían discutido la interacción de las fibrillas de colágeno con diferentes receptores de colágeno en las plaquetas para la adhesión y la formación de trombos de las plaquetas. Sin embargo, los autores no esperaron un papel relevante del receptor GPVI para la adhesión en una
25 situación clínica relevante *in vivo* ya que no pudieron validar la significación de los diferentes receptores de colágeno para el proceso de adhesión.

- Por lo tanto, la presente invención proporciona una solución al problema de inhibir la diana relevante para la interacción plaqueta-subendotelio y para la adhesión plaquetaria sin provocar efectos secundarios no deseados de complicaciones de sangrado. Aparte de la interacción bien conocida de colágeno-plaqueta a través del receptor GPVI, se pudieron proporcionar datos para la interacción de la matriz subendotelial nativa y las plaquetas medida mediante adhesión de plaquetas *in vivo*.

- En consecuencia, se pudo validar la significación de la interacción GPVI-endotelio para la adhesión plaquetaria como etapa inicial de la trombosis intravascular. Por lo tanto, la invención resuelve el problema de un tratamiento farmacológico antiplaquetas eficaz para la etapa importante de la adhesión de plaquetas sin efectos secundarios no deseados.

- Además, la invención proporciona un método para obtener una inmunoadhesina (la proteína de fusión obtenida mediante la invención). En una realización específica, la inmunoadhesina consiste en el dominio extracelular del receptor GPVI junto con la parte Fc de una inmunoglobulina de IgG (Fc-GPVI-nt). Esta proteína de fusión novedosa se basa aproximadamente en el 50 % en la secuencia de ADN de GPVI como se había publicado anteriormente. La estructura proteica de la inmunoadhesina es novedosa ya que la proteína de fusión recombinante no forma una proteína de membrana como el receptor GPVI es una inmunoadhesina similar a inmunoglobulina soluble liberada por la respectiva célula hospedadora. Esta inmunoadhesina puede bloquear la interacción ligando-receptor de colágeno y GPVI. Nuestros resultados demuestran que la inmunoadhesina tiene efectos marcados en las funciones fisiológicas principales de plaquetas inducidas por estimulación por colágeno. La agregación inducida por colágeno, la adhesión y la función de liberación puede inhibirse mediante la inmunoadhesina hasta el mismo punto que un anticuerpo monoclonal específico. El mecanismo, sin embargo, es diferente: mientras que el anticuerpo inhibe la
50 activación de GPVI uniéndose directamente al sitio de unión a ligando del receptor de GPVI, la inmunoadhesina captura al colágeno ligando de GPVI y por lo tanto evita la activación de GPVI mediada por ligando.

- La inmunoadhesina obtenida mediante la invención es un inhibidor de GPVI novedoso. Tiene la ventaja de inhibición selectiva de la rama activada de los efectos mediados por GPVI mediante captura de ligando. Se evitan efectos secundarios, tales como los efectos mediados por el anticuerpo en la internalización de receptor GPVI. Fc-GPVI-nt puede usarse para el tratamiento de complicaciones ateroscleróticas causadas por placas ateroscleróticas inestables con rotura de placa o lesión endotelial. Por lo tanto, la inmunoadhesina Fc-GPVI-nt sirve como inhibidor terapéutico para activación de GPVI mediada por colágeno sin afectar a la actividad intrínseca del receptor GPVI con el sistema de señalización relevante.

- 60 Además, la inmunoadhesina de GPVI sirve como epítipo ideal para la selección de anticuerpos. La parte Fc permite la purificación conveniente de la proteína y la fijación simple a superficies para efectuar selección de anticuerpos a gran escala contra bibliotecas de anticuerpos, es decir, mediante presentación de fagos. La selección permite la exploración selectiva de anticuerpos para el epítipo relevante que se asemeja a la proteína intacta con una
65 estructura similar a la de la proteína nativa.

Finalmente, la Fc-GPVI-nt es una herramienta importante para la exploración de inhibidores de la activación de receptor GPVI. Se ha establecido un ensayo *in vitro* basado en ELISA que simula la interacción colágeno-GPVI mediante placas pre-recubiertas con colágeno como ligando. Este ensayo puede ejecutarse como alternativa con Fc-GPVI-nt marcado fluorescentemente y por lo tanto puede ampliarse la escala a formatos de alto rendimiento. Este ensayo permite la exploración de ambos anticuerpos inhibidores o moléculas pequeñas por su potencia para inhibir la función de GPVI mediante medida de fluorescencia. Con este ensayo de exploración sin células, se ha establecido un método prototípico para un ensayo de exploración de fluorescencia escalable a alto rendimiento para ensayo de fármacos.

Basándose en las recientes mejoras en las técnicas de obtención de imágenes mediante ultrasonidos intravasculares o formación de imágenes mediante resonancia magnética nuclear, es posible identificar a pacientes con aterosclerosis que estén en riesgo de complicaciones clínicas agudas, tales como síndrome coronario agudo o carotídeo. Por la que los pacientes tienen lesiones activas como posibles causas de trombosis intravascular. Por lo tanto es posible prevenir mediante la presente invención la formación de trombosis intravascular administrando un medicamento que contiene un anticuerpo contra la glucoproteína VI (GPVI) de plaquetas sin efectos secundarios no deseados. Las lesiones activas están caracterizadas por el desenmascaramiento de los colágenos de la matriz subendotelial y la activación de plaquetas. La aparición de dichas lesiones puede investigarse, por ejemplo, mediante ultrasonidos intravasculares o termografía (por ejemplo, Fayed y Fuster, Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. Circulation 2001; 89:305-316) o formación de imágenes por resonancia magnética (Helft et al., Progression and Regression of Atherosclerotic Lesions. Circulation 2002; 105:993-998). Dichas lesiones son elevadamente probables en pacientes con síndromes coronario o carotídeo agudos, y el riesgo de recidiva de complicaciones clínicas agudas tales como infarto de miocardio o ictus es muy elevada, que disminuyen progresivamente con el aumento de la distancia temporal desde el suceso primario.

Por consiguiente, basándose en la presente invención, es posible tratar a pacientes que están en riesgo de aterosclerosis. Para prevenir la ateroprogesión, se trata a un paciente con la proteína de fusión obtenida por medio de la invención para prevenir la interacción entre plaquetas y el colágeno subendotelial expuesto. La proteína de fusión obtenida mediante la invención bloquea el ligando para el receptor GPVI de plaquetas en la pared vascular (por ejemplo, subendotelio) de tal forma que se inhibe una interacción entre las plaquetas y el colágeno expuesto.

La proteína de fusión obtenida mediante la invención puede estar en forma de un polvo liofilizado que se dispersa en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable antes de la administración al paciente. La proteína de fusión obtenida por medio de la invención también puede incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral, en el caso de tratamiento de complicaciones agudas preferentemente mediante administración intraarterial o intravenosa. Dichas composiciones normalmente comprenden a la proteína de fusión y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos y agentes isotónicos, que son compatibles con la administración farmacéutica. La presente invención incluye métodos para fabricar composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares crónicas o agudas. Dichos métodos comprenden formular un vehículo farmacéuticamente aceptable con la proteína de fusión obtenida por medio de la invención. En el caso del tratamiento de enfermedades cardiovasculares agudas, la composición preferentemente se administra por vía intravenosa o intraarterial. En el caso del tratamiento de enfermedades cardiovasculares crónicas, la composición puede administrarse por vía subcutánea o intraperitoneal. Dichas composiciones pueden incluir además compuestos activos adicionales, tales como polipéptidos adicionales (tales como insulina) o moléculas pequeñas terapéuticamente activas. Por lo tanto, la invención incluye adicionalmente métodos para preparar una composición farmacéutica formulando un vehículo farmacéuticamente aceptable con la proteína de fusión obtenida por medio de la invención y uno o más compuestos activos adicionales tales como insulina. En el caso de la coformulación de la proteína de fusión y la insulina para el tratamiento de pacientes diabéticos, se prefiere que la forma de dosificación permita el almacenamiento por separado de las distintas proteínas por lo que la mezcla de las proteínas se lleva a cabo inmediatamente antes o durante la administración de la composición. Por consiguiente, se considera la aplicación mediante una jeringuilla multicámara. Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta parenteral de administración prevista. Los ejemplos de las rutas de administración parenteral incluyen, por ejemplo, administración intraarterial e intravenosa. Las soluciones o suspensiones para uso parenteral pueden incluir un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, polietilenglicoles, aceites no volátiles, glicerina, propilenglicol, TWEEN u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro de sodio, dextrosa, sacarosa o manitosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico, agua bacteriostática, o suero salino tamponado con fosfato (PBS). El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula

necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestereato de aluminio y gelatina. Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar incorporando al compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente enumerados, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando al compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y criodesecado que dan lugar a un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales u orales en forma de dosificación unitaria. Las formas de dosificación unitarias son unidades discretas adecuadas como dosis unitarias para un paciente. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína de fusión (es decir, una dosificación efectiva) para el tratamiento de las complicaciones agudas está en el intervalo de 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 2 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal. Una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína de fusión (es decir, una dosificación efectiva) para el tratamiento de la ateroprogresión crónica está en el intervalo de 0,5 a 6 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 1 a 5 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de 2 a 5 mg/kg de peso corporal. El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata a un sujeto con la proteína de fusión de la invención frente a la ateroprogresión crónica en el intervalo de entre 0,5 a 6 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 1 a 5 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de 2 a 5 mg/kg de peso corporal, al menos dos veces a la semana.

Métodos para investigar la interacción de plaqueta-colágeno y la modulación mediante inhibidores

Agregación plaquetaria y liberación de ATP

La estimulación de plasma de ratón rico en plaquetas con concentraciones en aumento de colágeno tipo I bovino de 0,2 a 4 µg/ml provoca una agregación dependiente de la dosis desde un 2 hasta un 95 % y una liberación de ATP dependiente de la dosis desde 0 hasta 1,66 nM de liberación de ATP. Se eligió una concentración semimáxima de colágeno para experimentos posteriores. La incubación del plasma de ratón rico en plaquetas con el anticuerpo de GPVI JAQ1 anti-ratón específico (50 µg/ml y 100 µg/ml) anuló prácticamente por completo la agregación plaquetaria después de estimulación con 2 µg de colágeno /ml (con 50 µg de JAQ1: $2 \pm 0,7$; con 100 µg de JAQ 1: $1,5 \pm 0,3$ %). Además, se inhibió la liberación de ATP de manera dependiente de la dosis de anticuerpo a 1,09 nM de ATP (10 µg de anticuerpo/ml) o se anuló por completo (50 y 100 µg de anticuerpo/ml).

De modo similar, la incubación de plasma de ratón rico en plaquetas con la inmunoadhesina para GPVI (Fc-GPVI-nt) (50 µg/ml y 100 µg/ml) suprimió prácticamente por completo la agregación plaquetaria después de estimulación con 2 µg de colágeno/ml (con 50 µg de Fc-GPVI-nt $2 \pm 0,7$; con 100 µg de Fc-GPVI-nt: $1,5 \pm 0,3$ %) y liberación de ATP a 0 nM de ATP.

Por lo tanto, la inmunoadhesina inhibió suficientemente la activación de GPVI capturando al ligando natural de GPVI, colágeno. Tanto la función crucial de agregación plaquetaria y el mecanismo de liberación de las plaquetas determinado por liberación de ATP pudieron verse influenciados por la Fc-GPVI-nt.

Adhesión mediada por GPVI en condiciones de flujo fisiológico (cámara de flujo)

La adhesión de plaquetas en condiciones fisiológicas de cizalla se ensayaron en una cámara de flujo. La adhesión inicial y firme de las plaquetas se inhibió significativamente mediante la adición de la inmunoadhesina Fc-GPVI-nt en un 60 % (véase la figura 4).

Ensayo de unión a GPVI

La adhesión de Fc-GPVI-nt a placas recubiertas con colágeno se determinó en un ensayo de fluorescencia basado en ELISA. La unión de la inmunoadhesina Fc-GPVI-nt aumentó de manera dependiente de la dosis hasta niveles de saturación en una concentración de 0,2 a 10 µg de Fc-GPVI-nt (por favor, véase la figura 5). La especificidad se demostró comparando la unión de Fc-GPVI-nt con la de inmunoadhesina Fc vacía o la superficie de plástico no recubierta (véase la figura 6).

Métodos para investigar la adhesión y agregación plaquetarias en la lesión vascular *in vivo* como las etapas cruciales para la activación plaquetaria en sucesos vasculares agudos

Para probar la significación biológica de las interacciones plaqueta-colágeno en el proceso de adhesión a lesiones *in vivo*, se determinan las interacciones plaqueta-pared del vaso después de la lesión vascular de la arteria carótida de ratón. La lesión vascular para este lecho vascular importante puede servir como modelo para las primeras etapas de aterosclerosis, tales como la lesión endotelial en aterosclerosis temprana o la rotura de la placa en los estadios tardíos de la aterosclerosis con el desenmascaramiento de las fibrillas de colágeno del subendotelio. Además, este modelo permite el estudio de las complicaciones posteriores a la lesión vascular. Las lesiones endoteliales pequeñas conducen a una activación máxima de las plaquetas, con las etapas siguientes de adhesión y agregación plaquetaria. En etapas posteriores, los agregados plaquetarios pueden conducir a un embolismo desde la arteria carótida con el consiguiente accidente cerebrovascular. Por lo tanto, esta configuración experimental sirve como modelo relevante *in vivo* para un subgrupo de pacientes con aterosclerosis inestable que implica la rotura de la placa y las lesiones endoteliales que conducen al síndrome coronario agudo y al ictus.

La ligación vigorosa de la arteria carótida durante 5 minutos causa de manera consistente la pérdida completa de la capa celular endotelial e inicia la adhesión de plaquetas en el sitio de la lesión, según se determina mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 1a). Puede usarse microscopía de fluorescencia *in vivo* para visualizar directamente y cuantificar el proceso dinámico de acumulación de plaquetas después de la lesión vascular. Numerosas plaquetas se anclan a la pared vascular durante los primeros minutos después de la denudación vascular (4620 ± 205 plaquetas/mm²). Virtualmente todas las plaquetas que establecen contacto con el subendotelio muestran inicialmente una lenta traslación de superficie de tipo "arranque y parada" (Savage, B., Saldívar, E. y Ruggeri, Z.M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. Cell 1996; 84, 289-297). Aunque se observó la transición desde traslación lenta de superficie a adhesión irreversible de plaquetas en un 88 % de todas las plaquetas (4182 ± 253 plaquetas/mm²) (Figura 1b), la detención de plaquetas permanece transitoria en solo el 12 % (543 ± 32 plaquetas/mm²). Una vez que se establece la detención firme, las plaquetas adherentes reclutan plaquetas adicionales de la circulación, lo que da como resultado la formación de agregados (Figura 1c). Se obtienen características similares de reclutamiento de plaquetas con colágeno inmovilizado *in vitro*. Por el contrario, solo unas pocas plaquetas están ancladas a la pared vascular intactas en condiciones fisiológicas ($P < 0,05$ frente a lesión vascular) y virtualmente el 100 % de estas plaquetas se desplazan de la pared vascular sin detención firme ($P < 0,05$ frente a lesión vascular) (Figura 1a-c).

Identificación de GPVI como una proteína diana novedosa y relevante en las plaquetas para las lesiones vasculares *in vivo*

La elevada complejidad de la interacción plaqueta-pared del vaso que implica una variedad de diferentes receptores y vías de señalización hace que la inhibición *in vivo* de este proceso sea muy difícil. Aparte de GPIb-V-IX y la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que interactúan indirectamente con el colágeno mediante el factor de von Willebrand (vWF), se han identificado un gran número de receptores de colágeno en las plaquetas, incluyendo de manera muy importante a la integrina $\alpha_2\beta_1$ (Santoro, S.A. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. Cell 1986; 46, 913-920), GPV (Moog, S. et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. Blood 2001; 98, 1038-1046), y GPVI (Moroi, M., Jung, S.M., Okuma, M. y Shinmyozu, K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J Clin. Invest 84; 1440-1445). Entre varios informes de diferentes sistemas de señalización que juegan un papel *in vitro*, también se ha discutido GPVI (Gibbins, J.M., Okuma, M., Fandale, R., Barnes, M. y Watson, S.P. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. FEBS Lett. 1997; 413, 255-259; Nieswandt, B. et al. Long-term antithrombotic protection by *in vivo* depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193, 459-469; Nieswandt, B. et al. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001; 20, 2120-2130).

Para probar directamente *in vivo* la relevancia de las interacciones plaqueta-colágeno en la formación de trombos arteriales, se inhibió o eliminó GPVI *in vivo*. El anticuerpo monoclonal (AcM) JAQ1 bloquea el sitio de unión a colágeno principal en GPVI de ratón (Schulte, V., et al., Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. J Biol. Chem. 2001; 276, 364-368) e inhibe prácticamente por completo la adhesión plaquetaria a colágeno fibrilar inmovilizado en condiciones de flujo de alta cizalla (Nieswandt, B. et al. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001; 20, 2120-2130). Para estudiar la significación de las interacciones GPVI-colágeno en el proceso dinámico de adhesión/agregación plaquetaria en la formación de trombos arteriales, los ratones recibieron plaquetas singénicas marcadas por fluorescencia preincubadas con fragmentos Fab de JAQ1 o IgG de control emparejada de isotipo y se indujo la lesión carotídea como se describe anteriormente. De manera inesperada, se descubrió que la inhibición de GPVI redujo el anclaje inicial de plaquetas después de la denudación endotelial en la arteria carótida común en un 89 % ($P < 0,05$ frente a IgG de control, Figura 2a), un proceso que se pensaba que estaba mediado principalmente por la interacción GPIIb con vWF inmovilizado (Goto, S., Ikeda, Y., Saldívar, E. y Ruggeri, Z.M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. J. Clin. Invest. 1998; 101, 479-486; Sixma, J.J., van Zan-ten, G.H., Banga, J.D., Nieuwenhuls, H.K. y de Groot, P.G. Platelet adhesion. Semin. Hematol.

1995; 32, 89-98). Además, la detención estable de plaquetas se redujo en un 93 % mediante JAQ1 (Figura 2a). Se observó la transición desde anclaje inicial/traslación lenta de superficie a adhesión irreversible de plaquetas en solo un 58 % de aquellas plaquetas que establecían contacto inicial con la superficie subendotelial (en comparación con el 89 % con plaquetas pretratadas con IgG de control, $P < 0,05$, Figura 2b). La agregación de plaquetas adherentes estuvo virtualmente ausente después del pretratamiento de las plaquetas con fragmentos Fab de JAQ1, pero no en los controles ($P < 0,05$ frente a control, Figura 2c y d). Estos datos demostraron que las interacciones directas plaqueta-colágeno son cruciales para el anclaje inicial de las plaquetas y la posterior adhesión y agregación plaquetaria en sitios de lesión vascular. Además, estos descubrimientos demuestran que GPVI es un regulador clave en este proceso, mientras que otros receptores de la superficie, más importantemente GPIb-V-IX y $\alpha_2\beta_1$, no son suficientes para iniciar la adhesión y agregación plaquetaria sobre el endotelio *in vivo*.

Para descartar la posibilidad de que este efecto esté basado en el impedimento estérico de otros receptores, por ejemplo, GPIb-V-IX, mediante JAQ1 unido a superficie, se generaron ratones deficientes en GPVI mediante inyección de JAQ1 cinco días antes de la lesión vascular. Como se había comunicado anteriormente, dicho tratamiento induce una pérdida virtualmente completa de GPVI, por ejemplo, mediante internalización y degradación proteolítica de GPVI en plaquetas en circulación, lo que da como resultado un fenotipo de tipo "*knocout* en GPVI" durante al menos dos semanas (Neswandt, B., et al., Long-term anti-thrombotic protection by *in vivo* depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193, 459-469). Como se ilustra en la Figura 3a, GPVI era indetectable en plaquetas de ratones tratados con JAQ1 en el día 5 después de la inyección de 100 μ g/ratón de JAQ1, pero no IgG de control, mientras que la expresión de superficie y la función de todos los demás receptores ensayados, incluyendo GPIb-V-IX, $\alpha_{IIb}\beta_3$ y $\alpha_2\beta_1$ permaneció sin cambios en ambos grupos de ratones, lo que confirma resultados anteriores (datos no mostrados y Nieswandt, B. et al. Long-term antithrombotic protection by *in vivo* depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001; 193, 459-469).

Como se muestra por microscopía electrónica de barrido, la adhesión y agregación plaquetaria después de denudación endotelial en la arteria carótica común está virtualmente ausente en ratones deficientes en GPVI, pero no en ratones pretratados con IgG (Figura 3b). A continuación, se usó microscopía de videofluorescencia *in vivo* para definir la dinámica de adhesión plaquetaria después de lesión vascular en ratones deficientes en GPVI (Figura 3c-f). La pérdida de GPVI reduce significativamente en anclaje/traslación lenta de superficie de las plaquetas en el sitio de lesión vascular (en un 83 % en comparación con ratones pretratados con IgG, $P < 0,05$). Esta lenta traslación de superficie independiente de GPVI necesita la interacción cWF-GPIb α , ya que se abroga mediante la preincubación de las plaquetas con fragmentos Fab de un AcM bloqueante de la función contra GPIb α (p0p/B) lo que confirma el papel crítico de GPIb α en este proceso (no mostrado). En ausencia de GPVI, la adhesión estable de plaquetas se reduce en aproximadamente un 90 % en comparación con el control (tratado con IgG), mientras que la agregación de las plaquetas adherentes está prácticamente ausente (Figura 3b-f). Se observó la transición de anclaje de plaquetas a adhesión estable de plaquetas en solo un 58 % de todas las plaquetas ancladas inicialmente al sitio de la lesión (en comparación con el 89 % de las plaquetas pretratadas con el AcM de control, $P < 0,05$, Figura 3d), lo que indica que la traslación dependiente de GPIb α no es suficiente para promover la adhesión plaquetaria estable y posterior agregación.

La inhibición profunda del anclaje de plaquetas mediante el bloqueo de GPVI fue sorprendente y sugiere una función no reconocida previamente de este receptor en la fase más temprana de adhesión firme de plaquetas a lesiones vasculares. El colágeno fibrilar es un constituyente principal de las lesiones ateroscleróticas humanas (Rekhter, M.D., Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. Cardiovasc. Res. 1999; 41, 376-384; Rekhter, M.D. et al. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. Am. J Pathol. 1993; 143, 1634-1648; la síntesis potenciada de colágeno (mediante células musculares lisas íntimas y fibroblastos) contribuye significativamente al estrechamiento luminal en el proceso de la aterogénesis (Opsahl, W.P., DeLuca, D.J. y Ehrhart, L.A. Accelerated rates of collagen synthesis in atherosclerotic arteries quantified *in vivo*. Arteriosclerosis 1987; 7, 470-476). La rotura o fisura de la placa (ya sea espontáneamente o después de una angioplastia con balón) da como resultado la exposición de las fibrillas de colágeno a la circulación sanguínea.

La invención enseña por primera vez que dichos colágenos subendoteliales son el mayor activador de la formación de trombos arteriales y revela una función inesperada del receptor de colágeno GPVI en el reclutamiento de plaquetas al la pared del vaso lesionado. Los procesos de anclaje de plaquetas y traslación lenta de superficie en condiciones de alta cizalla se conocen por depender en gran medida de la interacción de GPIb α con vWF inmovilizado. Esta interacción es, sin embargo, insuficiente para establecer las interacciones iniciales plaqueta-pared del vaso *in vivo* ya que también se necesita GPVI funcional (Figuras 2 y 3). Por lo tanto, tanto GPIb α como GPVI tienen que actuar en concierto para reclutar plaquetas para el subendotelio. Durante el anclaje de plaquetas, la ligación de GPVI puede desplazar a las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ y $\alpha_2\beta_1$ desde un estado de baja afinidad hasta un estado de alta afinidad. Tanto $\alpha_{IIb}\beta_3$ como $\alpha_2\beta_1$ actúan por lo tanto en concierto para promover la posterior detención estable de plaquetas sobre colágeno, mientras que $\alpha_2\beta_3$ es esencial para la posterior agregación de plaquetas adherentes. Por lo tanto, la ligación de GPVI durante el contacto inicial entre plaquetas y colágeno subendotelial proporciona una señal de activación que es esencial para la adhesión y agregación plaquetaria posterior. Cabe destacar que, la ocupación o aglomeración lateral de GPIb α (durante la traslación de superficie dependiente de GPIb α), que indujo bajos niveles de activación de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ *in vitro* (Kasirer-Friede, A. et al., Lateral clustering of platelet GP Ib-IX

complexes leads to up-regulation of the adhesive function of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. J. Biol. Chem. 2002; Vol 277: 11949-11956), no es suficiente para promover la adhesión plaquetaria *in vivo*.

Por lo tanto, la invención ha identificado un receptor esencial para inhibir la unión de plaquetas al subendotelio. Un anticuerpo que bloquea la acción de GPVI con colágeno expuesto puede inhibir específicamente todas las fases principales de formación de trombos, es decir, anclaje de las plaquetas, adhesión firme, y agregación en sitios de lesión vascular (por ejemplo, durante síndromes coronarios agudos). La profunda protección que se logró mediante la inhibición o empobrecimiento de GPVI establece la importancia de la modulación farmacológica selectiva de las interacciones GPVI-colágeno para controlar la aparición y progresión de lesiones ateroscleróticas patológicas.

Después de la rotura de la placa aterosclerótica, la exposición del colágeno subendotelial es el principal activador que inicia la adhesión y agregación plaquetaria en el sitio de la lesión, seguido de la trombosis arterial (1;24;25). La glucoproteína de plaquetas GPVI, que se ha clonado recientemente (5;6), se ha identificado por medio de la invención como el principal receptor de colágeno de las plaquetas (4). que media la adhesión de las plaquetas tanto *in vitro* (22) y en condiciones (patofisiológicas *in vivo*) (3). Por lo tanto, la inhibición de GPVI previene el reclutamiento de plaquetas y la trombosis arterial en pacientes con aterosclerosis avanzada como se muestra por medio de la present invención por las actividades inhibitorias de la proteína de fusión específica Fc-GPVI-nt en la adhesión plaquetaria *in vitro* e *in vivo*.

La proteína de fusión Fc-GPVI-nt se expresa en células HELA que usan un sistema de expresión adenoviral para obtener Fc-GPVI-nt soluble. La caracterización de las formas solubles de GPVI reveló que Fc-GPVI-nt se secreta como dímero con una masa molecular de aproximadamente 160 kDa. Por consiguiente, Miura y colaboradores comunicaron recientemente que el dímero GPVI-Fc está presente como un dímero, en el que dos moléculas de dímero de GPVI-Fc se reticular por medio de enlaces disulfuro formados a partir de la Cys en el dominio Fc de cada molécula (21). Cabe destacar que, solo la forma dimérica de GPVI, pero no los monómeros del dominio extracelular de GPVI, se ha comunicado que muestran afinidad de unión a colágeno y que atenúan la agregación plaquetaria inducida por colágeno (21).

Se llevaron a cabo ensayos de unión para definir la interacción dímero de GPVI-Fc-colágeno. GPVI soluble se une a colágeno inmovilizado de manera saturable. La unión de dímero de GPVI-Fc a colágeno fibrilar fue elevadamente específica, ya que no sucedió con vWF o BSA inmovilizados. Además, la unión de GPVI a colágeno inmovilizado pudo inhibirse por medio de colágeno soluble. Se necesitaron elevadas concentraciones de colágeno soluble para bloquear la unión de dímero de GPVI-Fc, lo que indica que la proteína de fusión se une a colágeno inmovilizado con elevada afinidad. Análogamente, se ha comunicado una elevada constante de asociación y disociación (K_D aproximadamente de $5,8 \times 10^{-7}$ M) para la interacción GPVI-colágeno (21).

Se ha demostrado anteriormente que Fc-GPVI-nt atenúa la activación y agregación plaquetaria en respuesta a colágeno o convulxina, una toxina de serpiente, que se une a GPVI con elevada afinidad (6;21;27). Además de la agregación plaquetaria, GPVI está críticamente implicada en el proceso de adhesión plaquetaria a colágeno (3;22). En el presente estudio, se estudiaron por tanto los efectos de Fc-GPVI-nt en la adhesión plaquetaria en condiciones de flujo fisiológico *in vitro*. Se demuestra que Fc-GPVI-nt soluble inhibe la adhesión plaquetaria de manera dependiente de la dosis en condiciones de baja y alta cizalla *in vitro*. En presencia de Fc-GPVI-nt, pero no de péptido de Fc de control, la agregación de plaquetas adherentes estuvo virtualmente ausente, lo que indica que GPVI contribuye al proceso tanto de adhesión plaquetaria y la posterior activación por colágeno inmovilizado. GPVI confiere respuestas a colágeno (es decir, adhesión y agregación) de manera dependiente de la densidad de receptor (22). Análogamente, se ha comunicado que una reducción de más del 50 % en la expresión de GPVI en células RBL-2H3 transfectadas se asocia con una ausencia de agregación inducida por colágeno en estas células (8;22). Ya que se ha comunicado una baja variabilidad en la densidad de receptor GPVI aunque en una pequeña población de muestra (22), se puede esperar que una inhibición de aproximadamente el 50 % de las uniones colágeno-GPVI sea suficiente para atenuar el reclutamiento de plaquetas a colágeno expuesto. En el presente estudio, se necesitaron dosis de 1 mg/kg de Fc-GPVI-nt para inducir una inhibición significativa de la adhesión plaquetaria en flujo, lo que apoya la noción de que están disponibles múltiples sitios de unión a GPVI en cada fibrilla de colágeno. Se necesitaron cantidades similares de un anticuerpo anti-GPVI bloqueante de la función para atenuar la unión plaqueta-lesión de la pared vascular *in vivo* (3).

El colágeno fibrilar es un constituyente principal de la pared vascular normal pero también de lesiones ateroscleróticas (28). La rotura o fisura de la placa aterosclerótica da como resultado la exposición de fibrillas de colágeno a plaquetas circulantes. Como se notificó anteriormente, las interacciones GPVI-colágeno están esencialmente implicadas en la formación de trombos arteriales después de la lesión vascular (3). En el presente documento se demuestran los efectos *in vivo* de Fc-GPVI-nt soluble sobre el reclutamiento de plaquetas después de lesión arterial. La denudación endotelial se indujo mediante ligación reversible de aquella arteria carótida y se controló el proceso dinámico de unión de plaquetas mediante microscopía de videofluorescencia intravital tal como se ha descrito (3). Se demuestra por primera vez *in vivo* que Fc-GPVI-nt soluble atenúa el anclaje estable, la adhesión y la agregación de plaquetas después de la denudación endotelial. La inhibición del reclutamiento de plaquetas por Fc-GPVI-nt fue dependiente de la dosis. Aparte de prevenir la detención estable de plaquetas, Fc-GPVI-nt redujo significativamente el anclaje/traslocación lenta de superficie inicial en sitios de denudación endotelial.

Se ha demostrado anteriormente que la inhibición de GPIIb o de GPVI atenúa el anclaje de plaquetas con un alcance similar (3), lo que apoya que la interacción de GPVI y GPIIb necesita actuar en contacto para promover el anclaje de plaquetas al colágeno subendotelial (2;29-31). De hecho, las elevadas velocidades de "asociación" y "disociación" comunicadas para la interacción GPVI-ligando (22) son consistentes con el papel de GPVI como receptor de anclaje.

La presente invención identifica Fc-GPVI-nt como un principio activo de un medicamento para atenuar la trombosis arterial después de lesión vascular. Este concepto está apoyado adicionalmente por la observación de que Fc-GPVI-nt se dirige al subendotelio expuesto en el sitio de lesión vascular, como se demuestra mediante inmunohistoquímica. Esto implica que es probable que la inhibición de interacciones GPVI-colágeno esté restringida al sitio de lesión vascular, mientras que una inhibición sistémica prolongada de la función de plaquetas está limitada por la corta semivida esperada de Fc-GPVI-nt no unida. Por el contrario, la administración de anticuerpos monoclonales contra GPVI conduce de manera inevitable a la inhibición sistémica de GPVI en todas las plaquetas circulantes. Además, la administración de Fc-GPVI-nt no afectó a los recuentos de plaquetas. Por el contrario, los AcM anti-GPVI pueden inducir la trombocitopenia inmune o una pérdida completa de GPVI en las plaquetas circulantes (14;32), impidiendo su uso en la práctica clínica. Por consiguiente, la terapia con Fc-GPVI-nt estará probablemente asociada con un menor riesgo de hemorragia clínica, en comparación con las estrategias basadas en AcM anti-GPVI.

La adhesión y agregación plaquetaria en sitios de lesión vascular es crucial para la homeostasis, pero puede conducir a oclusión arterial en el marco de la aterosclerosis y puede precipitar enfermedades, tales como trombosis coronaria e infarto de miocardio. El uso de inhibidores de receptor GPIIb-IIIa intravenosos ha mejorado significativamente el éxito clínico de pacientes que se someten a implante de endoprótesis vascular coronaria (33-35). Sin embargo, se han comunicado que graves complicaciones de sangrado complican el resultado de los pacientes tratados con abciximab (36). La presente invención demuestra que la inhibición de las interacciones GPVI-colágeno mediante Fc-GPVI-nt fue suficiente para reducir de manera significativa la adhesión plaquetaria tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, la forma soluble de GPVI prolongó solo de manera moderada los tiempos de sangrado de la vena caudal. Análogamente, se han comunicado trastornos leves de sangrado en pacientes con plaquetas deficientes en GPVI (37), lo que indica que la coagulación y la homeostasis son efectivas incluso en completa ausencia de GPVI. En parte, esta discrepancia puede deberse al hecho de que la inhibición o ausencia de GPVI no interfiere con la agregación plaquetaria en respuesta a agonistas de plaquetas distintos de colágeno, por ejemplo, ADP, factor tisular o trombina. Por el contrario, la inhibición directa de GPIIb-IIIa, por ejemplo, mediante 7E3 o su derivado humanizado, bloquea la unión de fibrinógeno a las plaquetas, un proceso que es esencial para la agregación plaquetaria, y atenúa sustancialmente la agregación plaquetaria a la mayoría de agonistas de plaquetas conocidos hasta la fecha. Por consiguiente, la terapia con Fc-GPVI-nt se asocia con un riesgo menor de hemorragia clínica, en comparación con las estrategias basadas en anti-GPIIb-IIIa.

En conclusión, la presente invención proporciona la primera prueba *in vivo* de que Fc-GPVI-nt atenúa la adhesión plaquetaria en flujo *in vitro* y después de la denudación endotelial en la arteria carótida de ratones *in vivo*. Esto apoya adicionalmente al concepto de que las interacciones GPVI-colágeno juegan un papel central en todas las fases principales de la formación de trombos, es decir, anclaje de las plaquetas, adhesión firme, y agregación en los sitios de lesión arterial (por ejemplo, durante síndromes coronarios agudos). La presente invención además apoya el concepto de que GPVI juega un papel principal en la progresión de la aterosclerosis. Además, la presente invención demuestra por primera vez la conexión causal entre GPVI y la diabetes.

La invención se describirá a continuación en más detalle en referencia a los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplos

Animales. Se obtuvieron ratones C57BL6/J específicos libres de patógeno a través de Charles River (Sulzfeld, Alemania). Para los experimentos, se usaron ratones macho de 12 semanas de edad. Todos los procedimientos experimentales efectuados en animales fueron aprobados por la legislación alemana de protección de los animales. **Anticuerpos monoclonales.** Se generaron anticuerpo monoclonal (AcM) anti-GPVI (JAQ1) y anti-GPIIb (p0p/B) y fragmentos Fab de JAQ y p0p/B tal como se ha descrito (Bergmeier, W., Rackebrandt, K., Schroder, W., Zirngibl, H. y Nieswandt, B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIIb-IX with novel monoclonal antibodies. Blood 2000; 95, 886-893; Nieswandt, B., Bergmeier, W., Rackebrandt, K., Gessner, J.E. y Zirngibl, H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. Blood 2000; 96, 2520-2527). La IgG de rata irrelevante de control se obtuvo a través de Pharmingen (Hamburgo, Alemania).

Generación de ratones deficientes en GPVI.

Para generar ratones que carecen de GPVI, se inyectó a ratones C57BL6/J de tipo silvestre con 100 µg de JAQ1 i.c. Los animales se usaron para la determinación *in vivo* de la adhesión plaquetaria en el día 5 después de la inyección de AcM. La ausencia de expresión de GPVI en las plaquetas se verificó mediante análisis de transferencia de Western y citometría de flujo.

16

se controló la formación de placas en la capa celular que se recogieron usando una pipeta Pasteur, se resuspendieron en 0,5 ml de PBS de dulbecco y se almacenaron a -80 °C- Las placas se usaron para ciclos adicionales de amplificación en células 293.

5 *Construcción de células CHO con expresión estable de monómeros de GPVI-Fc humano*

Las células que expresaban el monómero se generaron de acuerdo con el ejemplo 2.

10 *Ejemplo 3: Purificación de la proteína Fc-GPVI-nt y de la inmunoadhesina de control de Fc*

El sobrenadante de cultivo de células HELA infectadas con Ad-Fc-GPVI-nt se recogió 2 días después de la infección, se centrifugó (3800 g, 30 min, 4°C) y se filtró (0,45 µm). Se precipitó la inmunoadhesina por adición de 1 vol. de sulfato de amonio (761 g/l) y se agitó durante toda la noche a 4 °C. Las proteínas se sedimentaron por centrifugación (3000 g, 30 min, 4 °C), se disolvió en 0,1 vol. de PBS y se dializó en PBS durante toda la noche a 4 °C. La solución de proteína se aclaró mediante centrifugación (3000 g, 30 min, 4°C) y se cargó en una columna de proteína A (HiTrap[™] proteína A HP, Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suecia). La columna se lavó con tampón de unión (tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0, NaN₃ al 0,02 %) hasta DO₂₈₀ < 0,01 y se eluyó con tampón de elución (glicina 100 mM pH 2,7). Las fracciones eluidas se neutralizaron con tampón de neutralización (Tris/HCl 1 M, pH 9,0, NaN₃ al 0,02 %), se agruparon, se dializaron en PBS durante toda la noche a 4 °C, se alicuotaron y se congelaron a -20 °C.

La masa molecular de la proteína Fc-GPVI-nt fue de ~80kDa en condiciones reductoras en SDS-PAGE, según se determinó mediante tinción de azul de Coomassie o mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado a peroxidasa o mediante el AcM anti-GPVI 5C4 (Figura 1a, panel superior e intermedio). Por el contrario, se identificó una proteína de 160 kDa en condiciones no reductoras (Figura 1a, panel inferior), lo que apoya la noción de que GPVI-Fc solo se obtiene como dímero (21).

25 *Ejemplo 4: Ensayo de exploración del inhibidor de GPVI*

Las placas de ELISA (Immulon2 HB, Dynx Technologies, Chantilly, VA) se recubrieron durante toda la noche a 4 °C con 1 µg/pocillo de colágeno (bovino de tipo I; BD Biosciences, Bedford, MA) en 100 µl de Tris/HCl 50 mM pH 8,0. La placa se lavó con 250 µl/pocillo de PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST) dos veces y se bloquearon con 250 µl/pocillo de Roti-Block (Roth, Karlsruhe, Germany) durante toda la noche. La placa se lavó con 250 µl/pocillo de PBST dos veces, se añadieron 100 µl de Fc-GPVI-nt en PBST (óptima 2 mg/pocillo) y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar cinco veces con 250 µl de PBST se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (Dianova, Hamburgo, Alemania) a una dilución 1:10000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de repetidos lavados con 250 µl de PBST se añadieron 100 µl de reactivo de detección (Sustrato POD BM Blue; Roche, Mannheim, Alemania) y se incubó durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1 M y la placa se midió a 450 nm frente a la longitud de onda de referencia de 690 nm. Para explorar inhibidores potenciales, los compuestos de ensayo se añaden a la incubación en 100 µl de PBST a varias concentraciones.

45 *Ejemplo 5: Agregación de las plaquetas y luminometría*

La agregación plaquetaria *ex vivo* e *in vitro* se evaluó mediante agregometría óptica en muestras de sangre citrada a 37 °C usando un agregómetro Chronolog de dos canales (Nobis, Alemania). El plasma rico en plaquetas se preparó a partir de sangre completa citrada mediante centrifugación (200 g durante 20 minutos). El recuento final de plaquetas se ajustó a 2 x 10⁸ plaquetas/ml con plasma autólogo. Después del ajuste del valor inicial, se añadió colágeno (tipo I, bovino) de 0,2 a 4 µg/ml y se registró la agregación durante 5 minutos. De manera simultánea, se registró la liberación de ATP usando el método de luminómetro de luciérnaga. La incubación con el anticuerpo monoclonal de GPVI JAQ1 se efectuó durante 15 minutos con 50 µg/ml de anticuerpo.

50 *Ejemplo 6: Ensayo de adhesión in vitro para la interacción GPVI/colágeno*

A partir de ACD (20 % de concentración final) se preparó plasma sanguíneo rico en plaquetas y se ajustó a una concentración final de 10⁸ plaquetas/ml mediante HEPES Tyrode (pH 6,5). Se recubrieron cubreobjetos con monocapas de varias proteínas adhesivas (colágeno, vWF) a diferentes concentraciones. Se llevaron a cabo los estudios de perfusión en una cámara de perfusión generada a partir de cubreobjetos de vidrio. La perfusión se llevó a cabo a velocidades de cizalla de 500/s que representan un flujo de medio bajo y a 2000/s que representan elevadas velocidades de cizalla. La adhesión se midió a 37 °C durante 20 minutos y después se arrastraron a lo largo de la cámara a velocidades de cizalla de pared fija durante 5 minutos usando una bomba de jeringuilla automática. Después de la perfusión, los cubreobjetos se lavaron cuidadosamente con Hepes Tyrode, recogido de la cámara. Los cubreobjetos se lavaron repetidas veces con Hepes Tyrode para eliminar por completo las plaquetas adhesivas. Las plaquetas en suspensión se analizaron cuantitativamente mediante medidas FACS. El análisis del estado funcional de las plaquetas se determinó adicionalmente mediante análisis de expresión de marcadores superficiales (CD41; CD61 y CD62P) de acuerdo con el protocolo estándar de citometría de flujo.

Ejemplo 7: *Preparación de plaquetas para microscopía intravital*

Las plaquetas (tipo silvestre o deficientes en GPVI) se aislaron a partir de sangre completa como se ha descrito (Massberg, S. et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. Blood 1998; 92, 507-515) y se marcaron con succinidil éster de diacetato de 5-carboxifluoresceína (DCF). La suspensión de plaquetas marcadas con DCF se ajustó a una concentración final de 200×10^6 plaquetas/ 250 μ l. En los casos donde se indica, las plaquetas de tipo silvestre fluorescentes se preincubaron con 50 μ g/ml de fragmentos de Fab anti-GPVI (JAQ1), o fragmentos Fab anti-GPIIb/IIIa (p0p/B) durante 10 minutos. A continuación, las plaquetas pretratadas junto con los fragmentos Fab se infundieron en ratones receptores tipo silvestre y se determinó la adhesión plaquetaria antes y después de la lesión carotídea mediante videomicroscopía *in vivo*, como se describe más adelante.

Ejemplo 8: *Evaluación de la adhesión de las plaquetas y agregación por microscopía intravital.*

Se anestesiaron ratones C57BL6/J de tipo silvestre o deficientes en GPVI mediante inyección intraperitoneal de una solución de midazolam (5 mg/kg de peso corporal, Ratiopharm, Ulm, Alemania), medetomidina (0,5 mg/kg de peso corporal, Pfizer, Karlsruhe, Alemania), y fentanilo (0,05 mg/kg de peso corporal, CuraMed Pharma GmbH, Munich, Alemania). Se implantaron catéteres de polietileno (Portex, Hythe, Inglaterra) en la vena yugular derecha y se infundieron plaquetas fluorescentes (200×10^6 /250 μ l) por vía intravenosa. Se diseccionó la arteria carótida común derecha y se ligó vigorosamente cerca de la bifurcación de la carótida durante 5 minutos para inducir lesión vascular. Antes y después de la lesión vascular, las plaquetas fluorescentes se visualizaron *in situ* mediante videomicroscopía *in vivo* de la arteria carótida común derecha. Las interacciones plaqueta-pared del vaso se controlaron usando un microscopio Zeiss Axiotech (objetivo de inmersión en agua 20 x, W 20x/0,5, Zeiss) con una lámpara de mercurio HBO de 100W para la epi-iluminación. Todas las imágenes grabadas en vídeo se evaluaron usando un programa de análisis de imágenes asistido por ordenador (Cap Image 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg, Alemania). Las plaquetas adherentes transitorias se definieron como células que cruzaban un límite perpendicular imaginario a través del vaso a una velocidad significativamente menor que la velocidad central; sus números se dan como células por mm^2 de superficie endotelial. El número de plaquetas adherentes se determinó contando las células que no se movieron o desprendieron de la superficie endotelial en 10 segundos. El número de agregados plaquetarios en el sitio de lesión vascular también se cuantificó y se presenta por mm^2 .

Ejemplo 9: *Microscopía electrónica de barrido.*

Después de la microscopía de videofluorescencia intravital, se perfusionó la arteria carótida con PBS (37 °C) durante 1 minuto, seguido de fijación por perfusión con glutaraldehído tamponado con fosfato (al 1 % vol/vol). Se extirpó la arteria carótida, se abrió longitudinalmente, se fijó adicionalmente mediante inmersión en glutaraldehído tamponado con PBS al 1 % durante 12 horas, se deshidrató con etanol, y se procesó mediante secado de puntos críticos con CO_2 . Posteriormente, las muestras de arteria carótida se orientaron con el lumen expuesto, se montaron con pintura de carbono, se recubrieron con pulverización de platino, y se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JSM-6300F, Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Ejemplo 10: *Determinación de unión de Fc-GPVI-nt a colágeno inmovilizado.* Se determinó la unión de Fc-GPVI-nt a colágeno inmovilizado. Las placas de ELISA (Immulon2 HB, Dynx Technologies, Chantilly, VA) se recubrieron durante toda la noche a 4 °C con 1 μ g de colágeno (tipo I bovino; BD Biosciences, Bedford, MA) en 100 μ l de tampón de recubrimiento (1,59 g/l de Na_2CO_3 , NaHCO_3 2,93 g/l, NaN_3 0,2 g/l, pH 9,6). Las placas se lavaron con 250 μ l/pocillo de PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST) dos veces y se bloquearon con 250 μ l/pocillo de Roti-Block (Roth, Karlsruhe, Alemania) durante toda la noche. Las placas se lavaron con 250 μ l/pocillo de PBST dos veces, después se añadieron 3,0, 6,0, 12,5, 25,0, o 100 μ g/ml de Fc-GPVI-nt en PBST y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. En los casos donde se indica, Fc-GPVI-nt (20 μ g/ml) se preincubó durante 10 minutos con colágeno soluble. Después de la incubación las placas se lavaron 5 veces con 250 μ l de PBST se añadió fragmento Fc γ de IgG de cabra anti-humano conjugado a peroxidasa específico (109-035-098; Dianova, Hamburgo, Alemania) a una dilución 1:10.000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después lavar 5 veces con 250 μ l de PBST se añadieron 100 μ l de reactivo de detección (Sustrato POD BM Blue; Roche, Mannheim, Alemania) y se incubaron durante hasta 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l de H_2SO_4 y la placa se midió a 450 nm frente a la longitud de onda de referencia de 690 nm.

Fc-GPVI-nt mostró unión dependiente de la dosis y estable a colágeno inmovilizado (Figura 9b). La unión semimáxima de colágeno se observó a una concentración final de Fc-GPVI-nt de 6,0 μ g/ml. La unión de GPVI-Fc no sucedió a BSA, vWF (Figura 9c, panel izquierdo) o Poli-L-Lisina (no mostrado), lo que apoya la especificidad de la unión de Fc-GPVI-nt. Además, no se detectó unión significativa a la proteína Fc de control que carece del dominio externo de GPVI en condiciones idénticas (Figura 9c, panel derecho).

Para determinar adicionalmente la especificidad de unión de GPVI, se ensayó la capacidad de competir de colágeno fibrilar solubilizado con colágeno inmovilizado para asociarse con Fc-GPVI-nt. El colágeno soluble inhibió la unión de Fc-GPVI-nt a colágeno inmovilizado de manera dependiente de la dosis (Figura 9d). Se necesitó una concentración de 100 μ g/ml de colágeno soluble para reducir la unión de Fc-GPVI-nt en más del 50 %. Juntos, estos datos indican

que la unión de Fc-GPVI-nt a colágeno es específica y se caracteriza por una elevada afinidad.

Ejemplo 11: Generación de anticuerpo monoclonal frente a GPVI humano. Se generaron anticuerpos monoclonales de manera general tal como se ha descrito (17). Se inmunizaron ratas Lou/C con la proteína de fusión Fc-GPVI-nt humana expresada en adenovirus. La exploración de sobrenadantes de hibridoma se efectuó en un inmunoensayo en fase sólida usando Fc-GPVI-nt o Fc que carece del dominio de GPVI. La exploración identificó que el sobrenadante de hibridoma 5C4 se une específicamente a Fc-GPVI-nt pero no a Fc que carece del dominio externo de GPVI. El tipo de inmunoglobulina se determinó con AcM de ratón específicos para clase Ig de rata (anti-IgM) y para subclase IgG. Los anticuerpos monoclonales se purificaron usando columnas de proteína G-sefarosa. La especificidad del anticuerpo 5C4 se verificó mediante inmunotransferencia frente a Fc-GPVI-nt y Fc de control. El anticuerpo monoclonal 5C4 detectó Fc-GPVI-nt expresado mediante adenovirus pero no Fc de control. Además, se recuperó GPVI humano en lisados obtenidos de plaquetas humanas. Además, 5C4 se une específicamente a la superficie de plaquetas pero no a leucocitos o glóbulos rojos, como se demostró usando citometría de flujo (no mostrado).

Ejemplo 12: Medición mediante FACS de externalización de CD62. Se recogió sangre humana citrada de voluntarios. El plasma rico en plaquetas (PRP) se generó después de los procedimientos de centrifugación y lavado (PBS 1 x; pH 7,2) a 2000 rpm a 4 °C y de resuspensión. Se incubó PRP diluido en tampón de tinción (1x PBS (w/o Ca^{2+} y Mg^{2+}) con azida de sodio al 0,1 % y suero fetal bovino al 2 % (FBS), CaCl₂ 2 mM) con colágeno equino tipo 1 (0; 2; 5 y 10 µg/ml; Nobis) en presencia de Fc-GPVI-nt (100 µg/ml) o concentraciones equimolares de Fc de control. Se añadieron anticuerpos anti-CD62P marcados con la peroxidasa de fluoróforo (Immunotech). La medición mediante FACS se efectuó con un dispositivo FACScalibur de Becton Dickinson.

Las concentraciones en aumento de colágeno condujeron a la secreción de plaquetas de gránulos alfa indicada por la externalización de CD62P. La coincubación de colágeno con Fc-GPVI-nt anuló la externalización de CD62P según se determinó mediante FACS (Figura 10).

Ejemplo 13: Agregación plaquetaria y liberación de ATP. Se generó PRP como se describe anteriormente. La agregación se determinó en un agregómetro de sangre completa 500VS (ChronoLog Corporation). El número celular de plaquetas de PRP se ajustó a $1,0 \times 10^8$ células/ml mediante tampón Thyrodes-HEPES (2,5 mmol/l de HEPES, NaCl 150 mmol/l, NaHCO₃ 12 mmol/l, KCl 2,5 mmol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, CaCl₂ 2 mmol/l, D-glucosa 5,5 mmol, BSA 1 mg/ml, pH 7,4). Se añadió Chrono-Lume N° 395 (Chrono-Log Corporation) para la medición de ATP. Se añadieron los agonistas a las plaquetas, se pipetearon en el agregómetro y se inició la agregación en condiciones de agitación definidas. La agregación se determinó por el cambio en la transmisión de la luz debido a las plaquetas coaguladas y se normalizó con un patrón interno. La liberación de ATP se determina a la longitud característica de Chrono-Lume para ATP y se normaliza con un patrón interno de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La agregación plaquetaria y la liberación de ATP se inhibieron específicamente mediante Fc-GPVI-nt para estimulación de agonista mediada por colágeno (Figura 11a y b). La agregación plaquetaria mediada por ADP y trombina (TRAP 10 µM) y la liberación de ATP no se vio afectada por Fc-GPVI-nt.

Ejemplo 14: Liberación de PDGF por parte de plaquetas humanas. Se preparó PRP de voluntarios humanos como se describe anteriormente. La liberación de PDGF por parte de plaquetas humanas se determinó con un sistema de kit (R & D Systems N° DHD00B) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La liberación de PDGF se estimuló con colágeno tipo 1 (20 µg/ml; Nobis) en condiciones de control y en presencia de Fc-GPVI-nt (100 µg/ml) o concentraciones equimolares de Fc de control. La liberación de PDGF se normaliza con el patrón de sonda del fabricante.

La liberación de PDGF como indicador de la liberación de transmisores endógenos desde alfa gránulos de plaquetas también se vio reducida después de la estimulación con colágeno. (Figura 11c)

Ejemplo 15: Efecto de Fc-GPVI-nt en el tiempo de sangrado de sangre humana completa in vitro. El tiempo *in vitro* de sangrado se determinó con un dispositivo PFA-100 (Dade-Behring). Se inyectaron 800 µl de sangre humana completa en el dispositivo PFA-100. El tiempo de sangrado se midió con celdas de medida recubiertas con ADP/colágeno y epinefrina/colágeno de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

No hubo una prolongación significativa del tiempo de sangrado *in vitro* (dispositivo PFA-100) con concentraciones en aumento de Fc-GPVI-nt después de estimulaciones con diferentes agonistas. Por el contrario, las concentraciones terapéuticamente relevantes de ReoPro prolongaron de manera máxima el tiempo de sangrado en el dispositivo PFA-10 (Figura 12).

Ejemplo 16: Efecto de GPVI soluble en la adhesión plaquetaria a colágeno inmovilizado en flujo. Las plaquetas humanas se aislaron de sangre completa anticoagulada con ADC como se ha descrito (18). Las plaquetas lavadas se resuspendieron en tampón Tyrodes-HEPES (HEPES 2,5 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, NaHCO₃ 12 mmol/l, KCl 2,5 mmol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, CaCl₂ 2 mmol/l, D-glucosa 5,5 mmol, BSA 1 mg/ml, pH 7,4) para obtener un recuento de plaquetas de 2×10^8 células/ml. La adhesión de plaquetas a placas recubiertas con colágeno inmovilizado se

determinó en una cámara de flujo de placa paralelo en presencia de 200 µg/ml de Fc-GPVI-nt o Fc de control.

GPVI juega un papel crucial en el proceso de reclutamiento de plaquetas a colágeno inmovilizado *in vitro* (22). Se determinó el efecto de Fc-GPVI-nt en la adhesión de plaquetas humanas a colágeno inmovilizado en condiciones de cizalla *in vitro*. Como otros comunicaron anteriormente (23), las plaquetas se adhirieron firmemente a colágeno inmovilizado a velocidades de cizalla tanto bajas (500 s⁻¹) como altas (1000 s⁻¹) formando trombos (Figura 13). Fc-GPVI-nt soluble pero no Fc de control que carece del dominio externo de GPVI atenuó significativamente la adhesión de plaquetas a colágeno inmovilizado en un 37 y un 44 % a velocidades de cizalla de 500 s⁻¹ y 1000 s⁻¹, respectivamente (Figura 13). La inhibición fue específica ya que Fc-GPVI-nt no afectó a la adhesión plaquetaria a vWF inmovilizado.

Ejemplo 17: La determinación de concentraciones de Fc-GPVI-nt en plasma se llevó a cabo con un sistema ELISA de IMMUNO-TEK para la determinación cuantitativa de IgG humana (ZeptoMetrix Corporation; N° de cat. 0801182). Se usan anticuerpos específicos de IgG de cabra anti-humano conjugados a peroxidasa contra la parte Fc de la Fc-GPVI-nt (Dianova). Después de varias etapas de lavado con PBST de acuerdo con las especificaciones del fabricante se añade sustrato de peroxidasa (POD BM Blue, Roche) y se mide a la longitud de onda característica de 450 nm en un lector de ensayo ELISA (Tecan Sunrise). La concentración de Fc-GPVI-nt se cuantifica mediante comparación a un patrón de IgG interno humano. Fc-GPVI-nt mostró una farmacocinética *in vivo* favorable. Después de una sola inyección intraperitoneal en ratones pudieron medirse elevados niveles después de 24 horas y la semivida de la proteína de fusión sobrepasó las 96 horas (Figura 14a). La inyección repetida por vía intraperitoneal condujo a una acumulación en sangre de la proteína de fusión (Figura 14b) lo que sugiere una cinética favorable para aplicación a largo plazo para el tratamiento de enfermedades crónicas. Después de una sola inyección por vía intravenosa de Fc-GPVI-nt con dosis en aumento, las concentraciones en plasma dependientes de la dosis de Fc-GPVI-nt fueron detectables desde 5 a 60 minutos y hasta 14 horas (Figura 14c).

Ejemplo 18: La preparación de plaquetas murinas para la microscopia intravital fluorescente. Se aislaron plaquetas murinas de sangre entera y se marcaron con succinidil éster de diacetato de 5-carboxifluoresceína (DCF), como se ha comunicado anteriormente (19). La suspensión de plaquetas marcadas con DCF se ajustó a una concentración final de 200 x 10⁶ plaquetas/ 250 µl. Se evaluó la adhesión de las plaquetas murinas antes y después de lesión en la arteria carótida, por medio de videomicroscopia *in vivo*, como se describe más adelante.

Ejemplo 19: Ligadura de la arteria carótida y evaluación de la adhesión de plaquetas y agregación por medio de microscopia intravital. Se realizó el reclutamiento de plaquetas después de denudación endotelial como ya se ha mencionado anteriormente (3). Resumiendo, se anestesiaron ratones C57BL6/J de tipo silvestre mediante inyección intraperitoneal de una solución de midazolam (5 mg/kg de peso corporal, Ratiopharm, Ulm, Alemania), medetomidina (0,5 mg/kg de peso corporal, Pfizer, Karlsruhe, Alemania), y fentanilo (0,05 mg/kg de peso corporal, CuraMed Pharma GmbH, Munich, Alemania). En los casos donde se indica, se administró Fc-GPVI-nt (1 o 2 mg/kg de peso corporal) o control de Fc en una cantidad equimolar a 2 mg/kg de Fc-GPVI-nt de manera intravenosa. A continuación, se indujo la denudación endotelial cerca de la bifurcación de la arteria carótida por medio de ligadura vigorosa durante 5 minutos. Después de la inducción de lesión vascular, se fusionaron plaquetas fluorescentes (200 x 10⁶/250 µl) a través de catéteres de polietileno (Portex, Hythe, England) implantados en la vena yugular derecha. Se visualizaron las plaquetas fluorescentes *in situ* por medio de la microscopia de video *in vivo* de la arteria carótida derecha común usando un microscopio Zeiss Axiotech (objetivo de inmersión en agua 20 x, W 20x/0,5, Zeiss) con una lámpara de mercurio HBO de 100W para la epi-iluminación. Todas las imágenes grabadas en vídeo se evaluaron usando un programa de análisis de imágenes asistido por ordenador (Cap Image 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg, Alemania (19;20)). Se definieron plaquetas ancladas como *todas* las células que establecen contacto inicial con la pared de vasos, seguido por la translocación lenta de superficie (a una velocidad sustancialmente más reducida que la velocidad central) o por la adhesión firme; sus números se dan como células por mm² de superficie endotelial. El número de plaquetas adherentes se determinó contando las células que no se movieron o desprendieron de la superficie endotelial en 10 segundos. El número de agregados plaquetarios en el sitio de lesión vascular también se cuantificó y se presenta por mm². Además, la zona entera del trombo se evaluó usando Cap Image 7.4.

Ejemplo 20: Microscopia electrónica de barrido. Después de la microscopia de videofluorescencia intravital, se perfusionó la arteria carótida con PBS (37 °C) durante 1 minuto, en tres animales por grupo, seguido de fijación por perfusión con glutaraldehído tamponado con fosfato (al 1 % vol/vol). Se extirpó la arteria carótida, se abrió longitudinalmente, se fijó adicionalmente mediante inmersión en glutaraldehído tamponado con PBS al 1 % durante 12 horas, se deshidrató con etanol, y se procesó mediante secado de puntos críticos con CO₂. Posteriormente, las muestras de arteria carótida se orientaron con el lumen expuesto, se montaron con pintura de carbono, se recubrieron con pulverización de platino, y se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JSM-6300F, Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Ejemplo 21: Evaluación de la unión in vivo de Fc-GPVI por inmunohistoquímica. Las arterias carótidas obtenidas de los ratones tratados con Fc-GPVI-nt se chocaron por congelación y se incluyeron en cryoblocks (Mediate, Medizintechnik GmbH, Burgdorf, Alemania). La unión de Fc-GPVI-nt al endotelio y al subendotelio se determinó en secciones de cryostat de 5 µm, teñidas con fragmento Fcγ específico de anticuerpo IgG de cabra anti-humano

conjugado a peroxidasa (109-035-098; Dianova, Hamburg, Alemania), Las arterias carótidas obtenidas de ratones tratados con Fc sirvieron como controles.

Ejemplo 22: Efecto del GPVI soluble en el recuento de plaquetas, tiempo de sangrado y adhesión de las plaquetas in vivo.

Se trató a los animales con 2 mg/kg o 4 mg/kg de Fc-GPVI-nt o dosis equimolares de Fc de control que carece del dominio GPVI externo. La infusión de Fc-GPVI-nt o Fc de control incluso a la dosis más alta de 4 mg/kg no tuvo efectos significativos en los recuentos periféricos de plaquetas. Además, la proteína de fusión Fc-GPVI-nt, no indujo ninguna prolongación significativa de los tiempos de sangrado de la vena caudal en comparación con animales de control (Figura 15a). Los tiempos absolutos de sangrado fueron $1,9 \pm 0,9$ en ratones tratados con PBS y $2,9 \pm 1,9$ minutos y $4,6 \pm 0,6$ minutos en ratones tratados con 2mg/kg o 4mg/kg de Fc-GPVI-nt. Por el contrario, se prolongaron de manera considerable los tiempos de sangrado ($42,6 \pm 21,6$) en animales tratados con integrilina (0,2 mg por kg IV).

Los efectos de Fc-GPVI-nt en el reclutamiento de plaquetas en un modelo de ratón de lesión de la arteria carótida pueden estudiarse usando microscopía de fluorescencia intravital. Los animales se trataron con 1 mg/kg o 2 mg/kg de Fc-GPVI-nt o una cantidad equimolar de un Fc de control que carecía del dominio externo de GPVI tal como se describe anteriormente. Después de la infusión de Fc-GPVI-nt o Fc de control se indujo la denudación endotelial de la arteria carótida de ratón mediante ligación vigorosa como se comunica anteriormente (3). La ligación de la arteria carótida causó de manera consistente la pérdida completa de la capa celular endotelial. La adhesión de plaquetas se visualizó y cuantificó de manera directa usando microscopía de fluorescencia *in vivo* (19:20) (Figura 15d). En los ratones de control (tratados con Fc) se anclaron numerosas plaquetas a la pared vascular durante los primeros minutos después de la denudación endotelial ($12,026 \pm 1,115$ plaquetas ancladas/mm²). Las plaquetas que establecían contacto con el subendotelio mostraron inicialmente una lenta traslocación de superficie, a lo que le sigue frecuentemente la posterior adhesión firme y agregación plaquetaria ($5,494 \pm 874$ plaquetas adherentes/mm² y 114 ± 17 trombos de plaquetas/mm²). Por el contrario, en presencia de Fc-GPVI-nt el reclutamiento de plaquetas al sitio de lesión vascular se atenuó de manera dramática. El anclaje de plaquetas se redujo en un 65 y un 71 % en comparación con los animales tratados con Fc después del pretratamiento con 1 mg/kg o 2 mg/kg de Fc-GPVI-nt ($P < 0,05$ frente a control). Paralelamente, la adhesión firme de plaquetas se redujo de manera dependiente de la dosis (en un 40 y un 65 % después de la administración de 1 mg/kg o 2 mg/kg de Fc-GPVI-nt, respectivamente. $P < 0.05$ frente a control). Del mismo modo, la agregación de plaquetas adherentes estaba prácticamente ausente en los animales tratados con 2 mg/kg de proteína de fusión Fc-GPVI-nt ($P < 0,05$ frente a Fc de control, Figura 15b-d). La microscopía electrónica de barrido también demostró claramente que la adhesión y agregación plaquetaria después de la denudación endotelial de la arteria carótida común estaba prácticamente ausente en los ratones tratados con Fc-GPVI-nt pero no en los ratones pretratados con Fc (Figura 15e). Para confirmar la presencia de Fc-GPVI-nt en el sitio de la lesión, las arterias carótidas se extirparon después de la microscopia *in vivo* y se procesaron adicionalmente para inmunohistoquímica usando anticuerpos IgG de cabra anti-humano conjugados a peroxidasa. En los ratones tratados con Fc-GPVI-nt se detectó Fc-GPVI-nt en el área luminal del sitio de la lesión vascular (Figura 15f). Juntos, estos datos demuestran que Fc-GPVI-nt se une específicamente a los sitios de lesión vascular *in vivo* y evita el posterior reclutamiento de plaquetas.

Efecto de GPVI soluble en la aterosclerosis. Los ratones apoE -/- de 4 semanas de edad (The Jackson Laboratory) consumieron una dieta con colesterol al 0,25 % (Harlan Research diets) durante 6 semanas. Después de 2 semanas se inyectó a 4 ratones apoE -/- con Fc-GPVI-nt a 200 µg por ratón dos veces a la semana con dieta de colesterol continua. Se inyectó a 4 ratones apoE -/- mice con el mismo protocolo con la proteína Fc de control (200 µg) dos veces a la semana y sirvieron como ratones de control. Para la evaluación de la formación de placa, se sacrificó a los animales y el árbol vascular se diseccionó cuidadosamente de los animales. Las preparaciones completas de la aortas y carótidas se enjuagaron con cloruro de sodio al 0,9 % y se fijaron. La preparación vascular completa se tiñó con rojo SUDAN III para determinar la formación de placa y se visionaron al microscopio. El tratamiento de ratones apoE -/-*knockout* propensos a la aterosclerosis con Fc-GPVI-nt durante 4 semanas disminuyó de manera significativa la ateroprogresión. (Figura 16).

Ejemplo 23: Medición en FACS de la expresión de superficie de CD61 y CD32 en las plaquetas de pacientes diabéticos. Se recogió sangre humana citrada de 111 pacientes que padecen diabetes o de 363 pacientes que no padecen diabetes. El plasma rico en plaquetas (PRP) se generó después de los procedimientos de centrifugación y lavado (PBS 1 x, pH 7,2) a 2000 rpm a 4 °C y de resuspensión. Se añadieron anticuerpos anti-CD61 o anti-CD32 marcados con la peroxidasa de fluoróforo (Immunotech) o el anticuerpo monoclonal 4C9 anti-GPVI marcado con FITC. La medición mediante FACS se efectuó con un dispositivo FACScalibur de Becton Dickinson. Se cuantificó la expresión de superficie por fluorescencia. Se calculó la correlación de la fluorescencia de CD32 y la fluorescencia de 4C9 con el coeficiente de correlación $r = 0,516$.

Análisis Estadístico. Las comparaciones entre medias de grupo se llevaron a cabo usando la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Los datos representan la media +/- d.t.m. Un valor de $P < 0,05$ se consideró como significativo.

Lista de Referencias

1. Baumgartner, H.R. 1977. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested suben-dothelium. *Thromb Haemost* 37:1-16.
2. Clemetson, K.J. y Clemetson, J.M. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 86:189-197.
3. Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhöfer, D., Heinzmann, U., y Nieswandt, B. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J. Exp. Med.* 197:41-49.
4. Moroi, M., Jung, S.M., Okuma, M., y Shinmyo-zu, K. 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin. Invest* 84:1440-1445.
5. Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., y Clemetson, K.J. 1999. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α 1-phaR and the natural killer receptors. *J Biol. Chem.* 274:29019-29024.
6. Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J.P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C. et al. 2000. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96:1798-1807.
7. Gibbins, J.M., Okuma, M., Famdale, R., Barnes, M., y Watson, S.P. 1997. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 413:255-259.
8. Zheng, Y.M., Liu, C., Chen, H., Locke, D., Ry-an, J.C., y Kahn, M.L. 2001. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma-chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol. Chem.* 276:12999-13006.
9. Suzuki-Inoue, K., Tulasne, D., Shen, Y., Bori-Sanz, T., Inoue, O., Jung, S.M., Moroi, M., Andrews, R.K., Berndt, M.C., y Watson, S.P. 2002. Association of Fyn and Lyn with the proline rich domain of GPVI regulates intracellular signalling. *J Biol. Chem.*
10. Barnes, M.J., Knight, C.G., y Famdale, R.W. 1998. The collagen-platelet interaction. *Curr. Opin. Hematol.* 5:314-320.
11. Falet, H., Barkalow, K.L., Pivniouk, V.I., Barnes, M.J., Geha, R.S., y Hartwig, J.H. 2000. Roles of SLP-76, phosphoinositide 3-kinase, and gelsolin in the platelet shape changes initiated by the collagen receptor GPVI/FcR gamma-chain complex. *Blood* 96:3786-3792.
12. Pasquet, J.M., Gross, B., Quek, L., Asazuma, N., Zhang, W., Sommers, C.L., Schweighoffer, E., Ty-bulewicz, V., Judd, B., Lee, J.R. et al. 1999. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase Cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol. Cell Biol.* 19:8326-8334.
13. Benanga, O., Tulasne, D., Bori, T., Snell, D.C., Miura, Y., Jung, S., Moroi, M., Frampton, J., y Watson, S.P. 2002. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur. J. Biochem.* 269:2951-2960.
14. Sugiyama, T., Okuma, M., Ushikubi, F., Sen-saki, S., Kanaji, K., y Uchino, H. 1987. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 69:1712-1720.
15. Sugiyama, T., Ishibashi, T., y Okuma, M. 1993. Functional role of the antigen recognized by an antiplatelet antibody specific for a putative collagen receptor in platelet-collagen interaction. *Int. J. Hematol.* 58:99-104.
16. Schulte, V., Snell, D., Bergmeier, W., Zimigib, H., Watson, S.P., y Nieswandt, B. 2001. Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. *J Biol. Chem.* 276:364-368.
17. Kremmer, E., Kranz, B.R., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H.J., Delsol, G. et al. 1995. Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* 208:336-342.
18. Dickfeld, T., Lengyel, E., May, A.E., Massberg, S., Brand, K., Page, S., Thielen, C., Langenbrink, K., y Gawaz, M. 2001. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* 49:189-199.

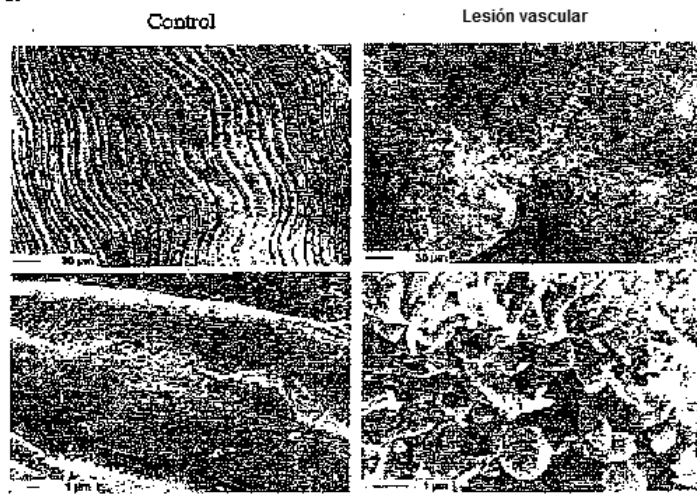
19. Massberg,S., Enders,G., Leiderer,R., Eisen-menger,S., Vestweber,D., Krombach,F., y Mess-mer,K. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92:507-515.
20. Massberg,S., Enders,G., Matos,F.C., Tomic,L.I., Leiderer,R., Eisenmenger,S., Messmer,K., y Krombach,F. 1999. Fibrinogen deposition at the pos-tischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94:3829-3838.
21. Miura,Y., Takahashi,T., Jung,S.M., y Moroi,M. 2002. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J. Biol. Chem.* 277:46197-46204.
22. Chen,H., Locke,D., Liu,Y., Liu,C., y Kahn,M.L. 2002. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *J Biol.Chem.* 277:3011-3019.
23. Savage,B., Almus-Jacobs,F., y Ruggeri,Z.M. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94:657-666.
24. van Zanten,G.H., de Graaf,S., Slootweg,P.J., Heijnen,H.F., Connolly,T.M., de Groot,P.G., y Six-ma,J.J. 1994. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin.Invest* 93:615-632.
25. Baumgartner,H.R., Muggli,R., Tschopp,T.B., y Turitto,V.T. 1976. Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function. *Thromb.Haemost.* 35:124-138.
27. Jandrot-Perrus,M., Lagrue,A.H., Okuma,M., y Bon,C. 1997. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol.Chem.* 272:27035-27041.
28. Rekhter,M.D. 1999. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardio-vasc.Res.* 41:376-384.
29. Ruggeri,Z.M. 1997. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb.Haemost.* 78:611-616.
30. Goto,S., Ikeda,Y., Saldivar,E., y Ruggeri,ZM. 1998. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J.Clin.Invest.* 101:479-486.
31. Sixma,J.J., van Zanten,G.H., Banga,J.D., Nieu-wenhuls,H.K., y de Groot,P.G. 1995. Platelet adhesion. *Semin.Hematol* 32:89-98.
32. Nieswandt,B., Schulte,V., Bergmeyer,W., Mokhtari-Nejad,R., Rackebrandt,K., Ca- zenave,J.P., Ohlmann,P., Gachet,C., y Zimgi-bl,H. 2001. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 193:459-469.
33. Lincoff,A.M., Califf,R.M., y Topol,E.J. 2000. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 35:1103-1115.
34. Neumann,F.J. y Schömig, A. 1998. Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with coronary stent placement. *Semin.Interv.Cardiol.* 3:81-90.
35. Bertrand,M.E., Rupprecht,H.J., Urban,P., Ger-shlick,A.H., e Investigadores,f. 2000. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study(CLASSICS). *Circulation* 102:624-629.
36. Foster,R.H. y Wiseman,L.R. 1998. Abciximab. An updated review of its use in ischaemic heart disease. *Drugs* 56:629-665.
37. Arai, M., Yamamoto,N., Moroi,M., Akamatsu,N., Fukutake,K., y Tanoue,K. 1995. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br.J Haematol.* 89:124-130.

REIVINDICACIONES

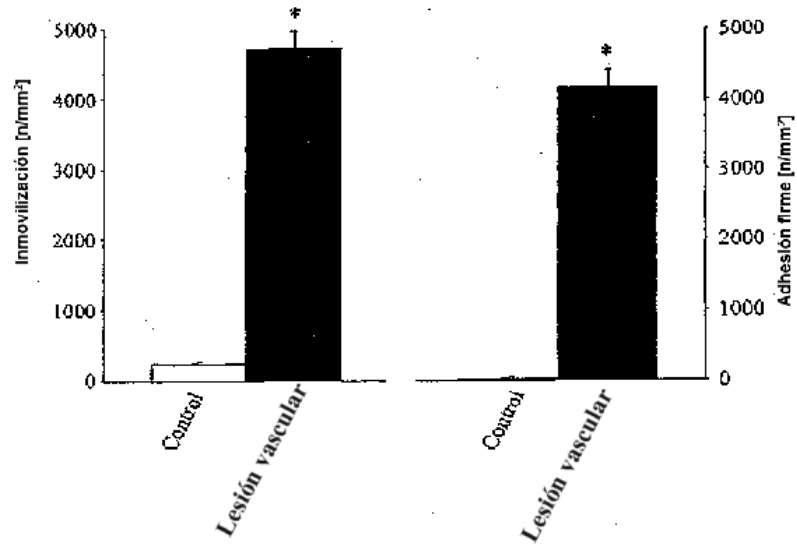
1. Un método para obtener una proteína de fusión soluble Fc-GPVI-nt que comprende una secuencia de aminoácidos de la Figura 7, el método comprende expresar la proteína de fusión Fc-GPVI-n que consiste en una
5 secuencia de aminoácidos de la Figura 7 en células HELA usando un sistema de expresión adenoviral.
2. El método de reivindicación 1, donde la proteína de fusión se obtiene como una proteína dimérica.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el adenovirus comprende una secuencia de ácidos nucleicos
10 de la Figura 8.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende las siguientes etapas:

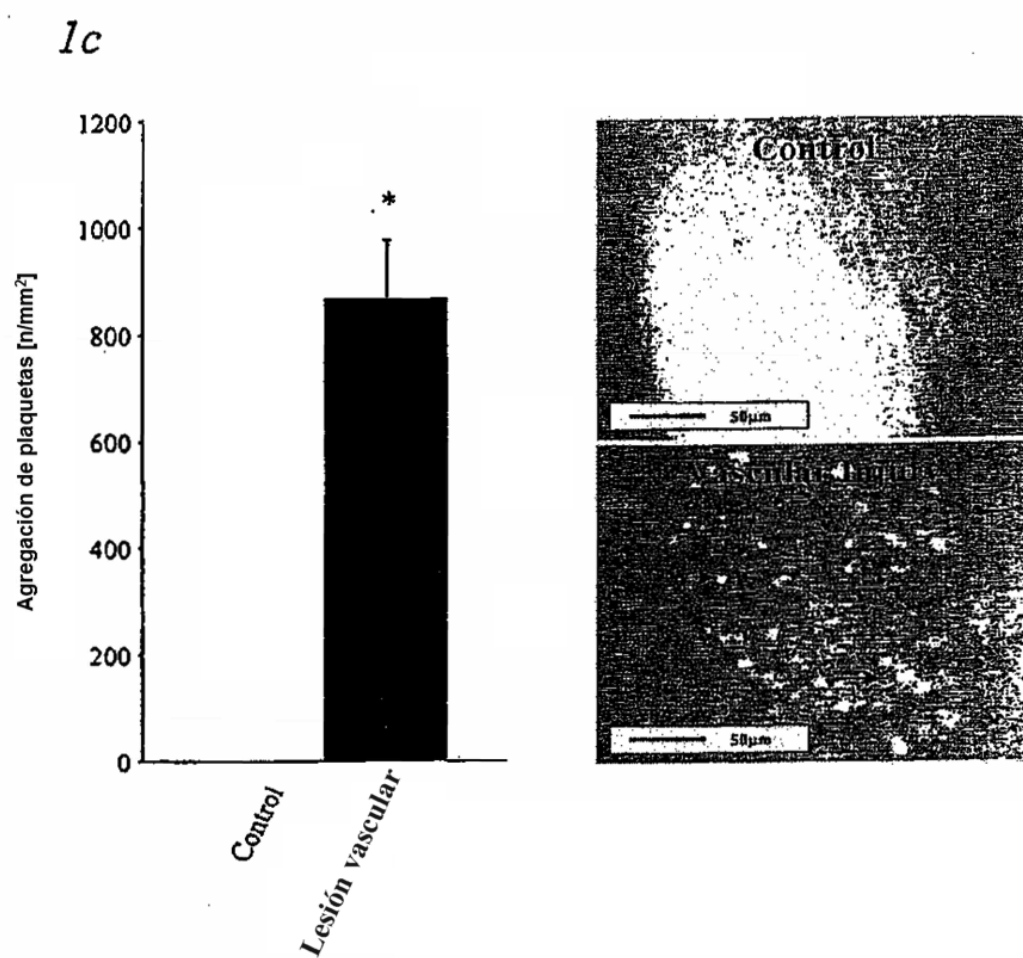
 (a) recoger 2 días después de la infección los sobrenadantes de cultivo de células HELA infectadas con adenovirus
15 para Fc-GPVI-nt que codifica una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la figura 7;
 (b) centrifugar (3800 g, 30 min, 4 °C) el sobrenadante de la etapa (a);
 (c) filtrar (0,45 urn) el sobrenadante de la etapa (b);
 (d) precipitar la inmunoadhesina por adición de 1 vol. de sulfato de amonio (761 g/l) y agitar durante toda la noche
20 a 4 °C;
 (e) precipitando las proteínas por centrifugación (3000 g, 30 min, 4°C);
 (f) disolviendo las proteínas precipitadas de la etapa (e) en 0,1 Vol de PBS y dializando en PBS durante toda la
 noche a 4°C;
 (g) aclarar la solución de proteína por centrifugación (3000 g, 30 min, 4°C);
 (h) cargar la solución de la etapa (g) en una columna de proteína A (HiTrap™ proteína A HP, Amersham
25 Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suecia);
 (i) lavar la columna con tampón de unión (tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,0, NaN³ al 0,02 %) hasta
DO₂₈₀ <0,01;
 (k) eluir las fracciones con tampón de elución (glicina 100 mM a pH 2,7);
 (l) neutralizando las fracciones eluidas con tampón de neutralización (Tris/HCl 1 M a pH 9,0, NaN³ al 0,02 %);
30 (m) agrupar las fracciones;
 (n) dializar las fracciones agrupadas en PBS durante toda la noche a 4°C;
 (o) preparar alícuotas del producto dializado y congelando a -20 °C.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende obtener la proteína de fusión y
35 dispersar el polvo liofilizado que contiene la proteína de fusión en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable.
6. El método de la reivindicación 5 que comprende formular la proteína de fusión en una composición farmacéutica
para la administración parenteral.

1a

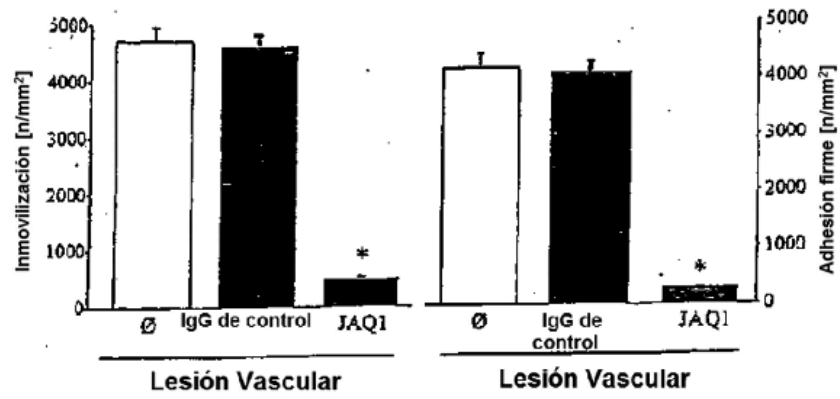


1b

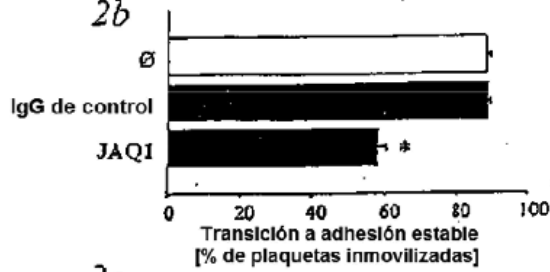




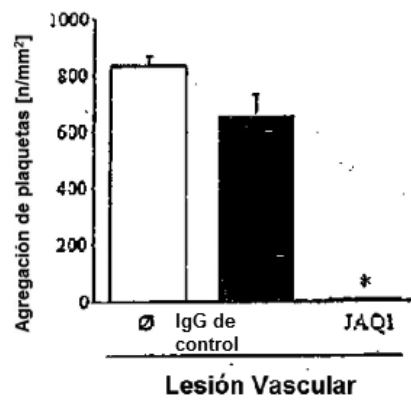
2a



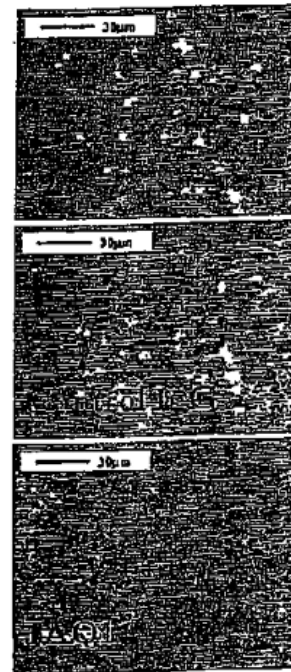
2b



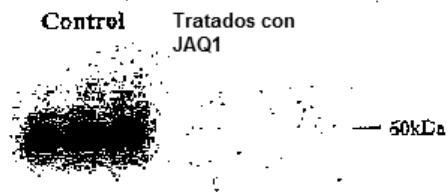
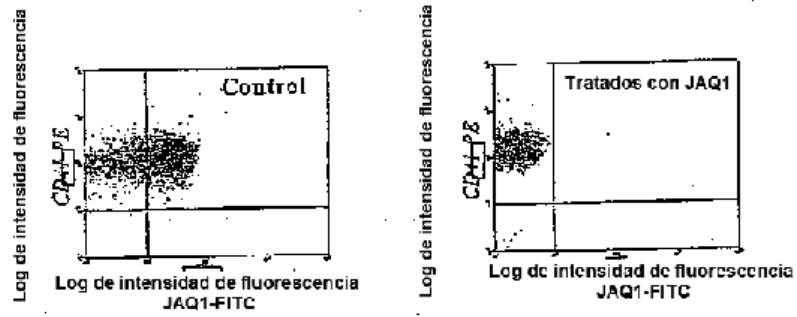
2c



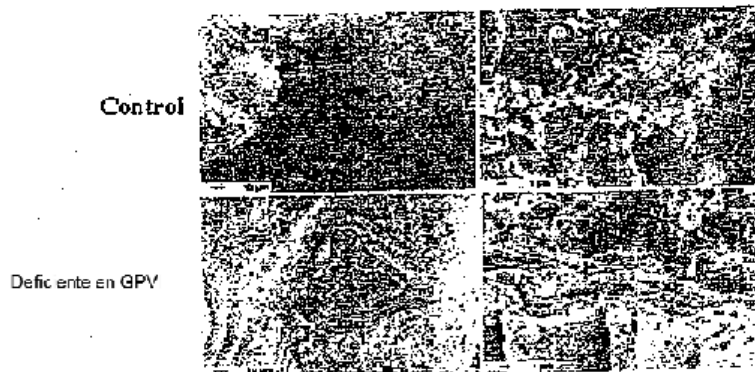
d



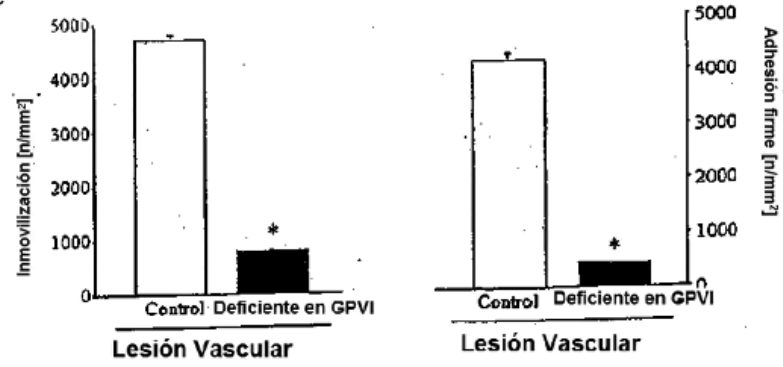
3a



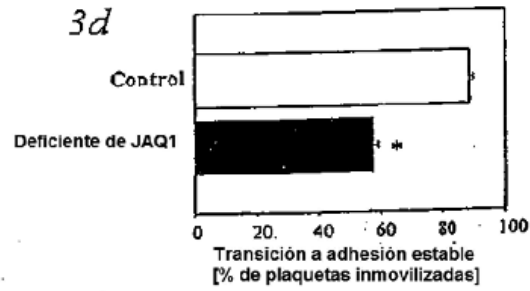
3b



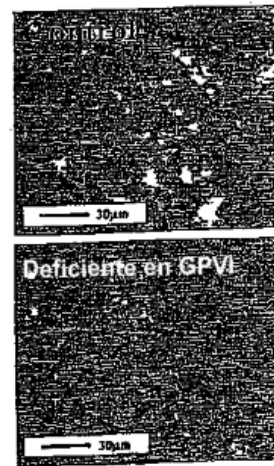
3c



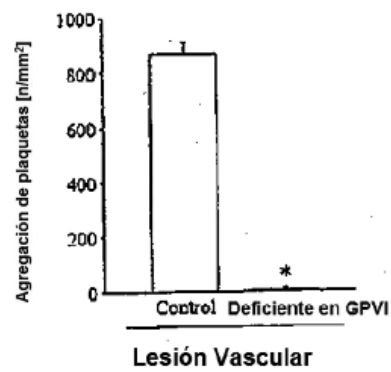
3d



f



3e



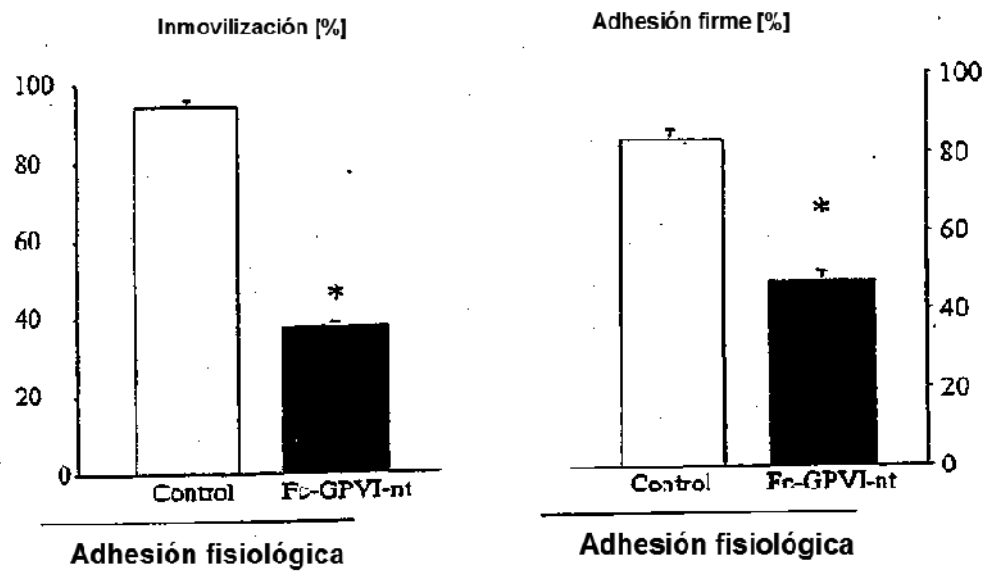


Fig. 4

Unión de Fc-GPVI-nt a colágeno I bovino

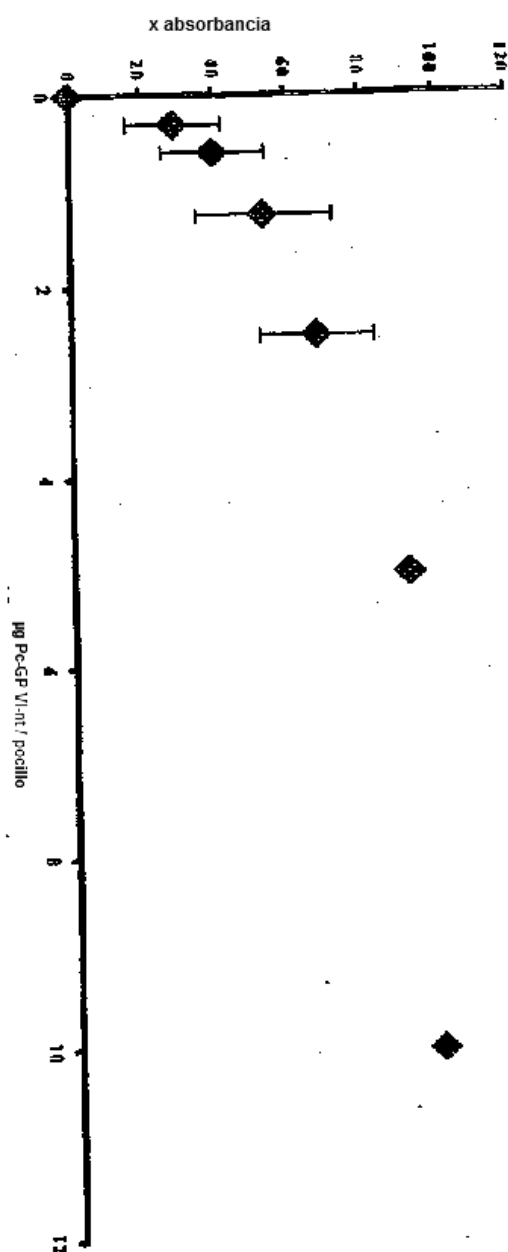


Fig. 5

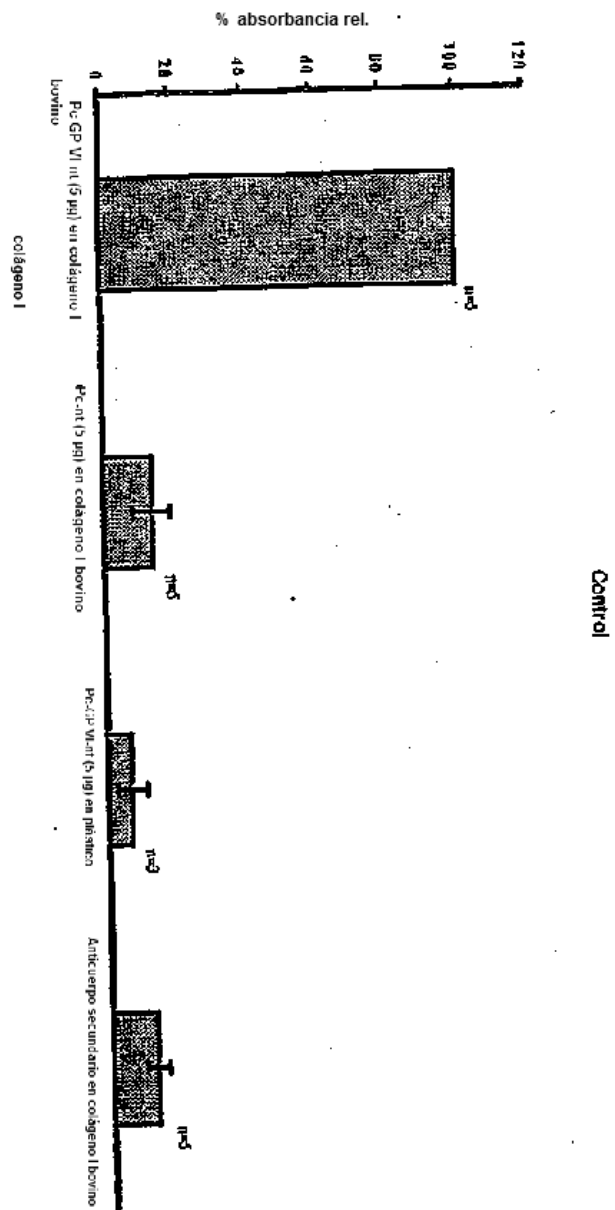


Fig. 6

```

1  MSPSPPTALFC LGLCLGRVPA QSGPLPKPSL QALPSSSLVPL EKPVTLRCCG
51  PPGVDLYRLE KLSSSRVQDQ AVLFIPAMKR SLAGRYRCSY QNGSLWSLPS
101 DQLELVATGV FAKPSLSAQF GPAVSSGGDV TLQCQTRYGF DQFALYKEGD
151 PAPIKNPERW YRASFPITV TAAHSGTYRC YSFSSRDPYL WSAPSDPLEL
201 VVTGTSVTPS RLPTEPPSSV AEFSEATAEL TVSFTNKVFT TETSRSTITTS
251 PKESDSPAGP ARQYYTKGNG GRESKSCDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF
301 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE
351 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
401 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
451 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
501 SPGK*

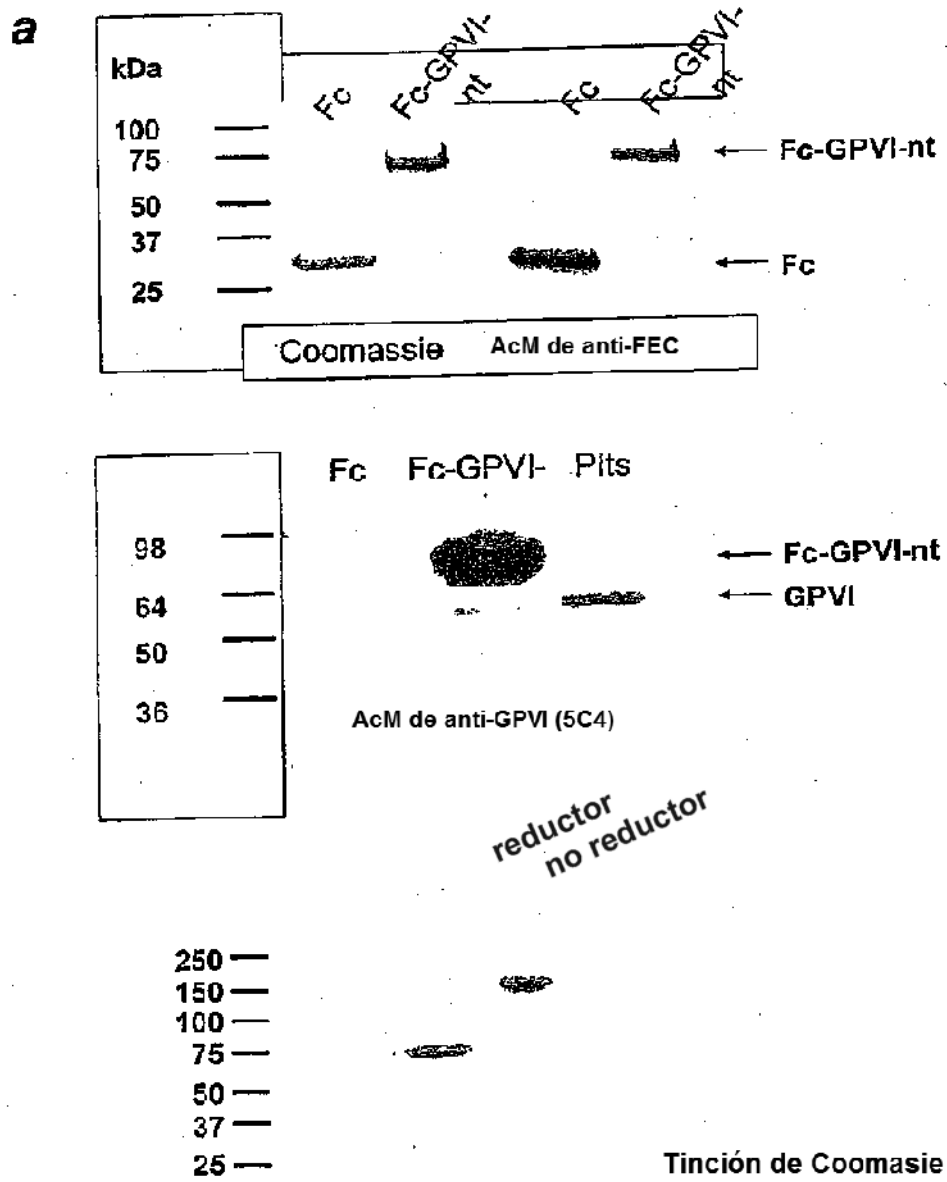
```

Fig. 7

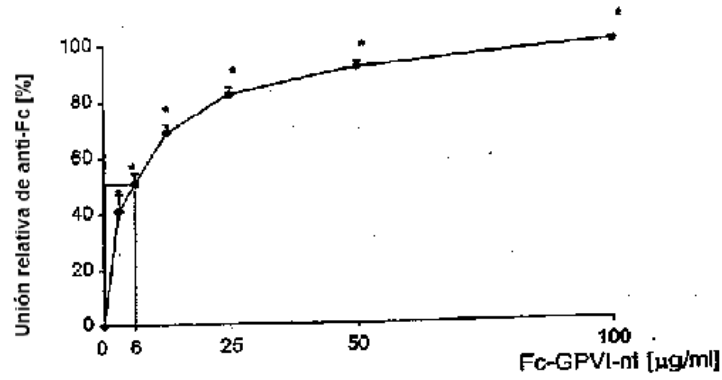
1 ATGTCTCCAT CCCCAGCCGC CCTCTTCTGT CTGCGCTGT GTCTGGGGCG
 51 TGTGCCAGCG CAGAGTGGAC CGCTCCCCAA GCOCTCCCTC CAGGCTCTGC
 101 CCAGCTCCCT GGTGCCCTG GAGAAGCCAG TGACCCCTCCG GTGCCAGGGA
 151 CCTCCGGGCG TGGACCTGTA CCGCCCTGGG AAGCTGAGTT CCAGCAGGTA
 201 CCAGGATCAG GCAGTCTCT? TCATCCCGGC CATGAAGAGA AGTCTGGCTG
 251 GACGCTACCG CTGCTCCTAC CAGAACGGAA GCCTCTGGTC CCTGCCCAGC
 301 GACCAGCTGG AGCTCCTTGC CACGGGAGTT TTGCCCAAAC CCTCGCTCTC
 351 AGCCAGCCCC GGCCTGGCGG TGTGCTCAGG AGGGGACGTA ACCCTACAGT
 401 GTCAGACTCG STATGGCTTT GACCAATTTG CTCTGTACAA GGAGGGGGAC
 451 CCTGCGCCCT ACAAGAATCC CGAGAGATGG TACCGGGCTA GTTCCCCAT
 501 CATCAGGGTG ACCGCCGCC ACAGCGGAAC CTACCGATGC TACAGCTTCT
 551 CCAGCAGGGA CCCATACCTG TGGTCGCCCC CCAGCGACCC CCTGGAGCTT
 601 GTGGTCACAG GAACCTCTGT GACCCCCAGC CGGTTACCAA CAGAACCACC
 651 TTCTCGGTA GCAGAATTCT CAGAAGCCAC CGCTGAAGTG ACCGTCTCAT
 701 TCACAAACAA AGTCTTCACA ACTGAGACTT CTAGGAGTAT CACCACCAGT
 751 CCAAGGAGT CAGACTCTCC AGCTGGTCTT GCCCGCCAGT ACTACACCIA
 801 GGGCAACGGC GGCCTGGAGT CCAATCTTG TGACRAAAT CACACATGCC
 851 CACCGTGCCC AGCACCAGAA CTCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC
 901 CCCCCAAAC CCAAGGACAC CTTATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC
 951 ATGCGTGCTG GTGGACGTA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
 1001 GSTACGTGGA CGCGGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
 1051 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCTGCA
 1101 CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAG
 1151 CCTCCCAGC CCCATCGAG AAPACCATCT CCAAGGCCAA AGGGCAGCCC
 1201 CGAGAGCCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA
 1251 GAACCAAGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA
 1301 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGACPA CTACAAGACC
 1351 AGCCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT
 1401 CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG
 1451 TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
 1501 TCTCCGGGTA AATGA

Fig. 8

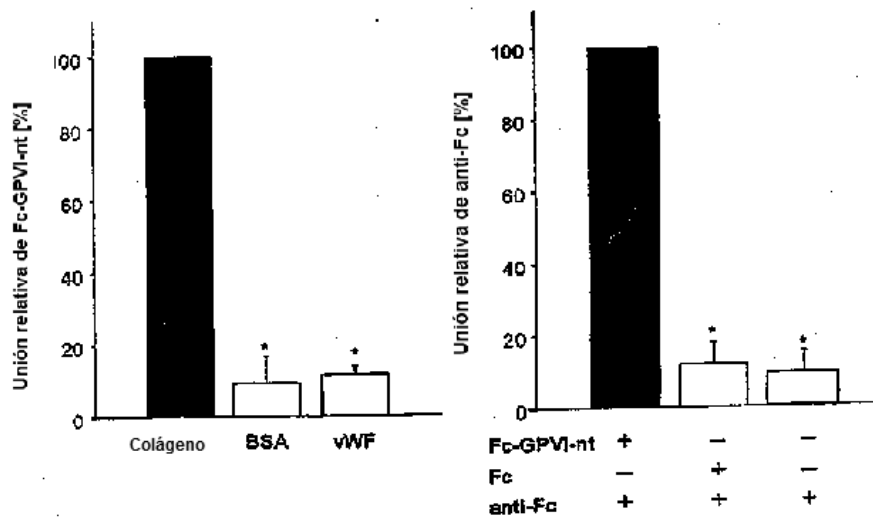
Figura 9



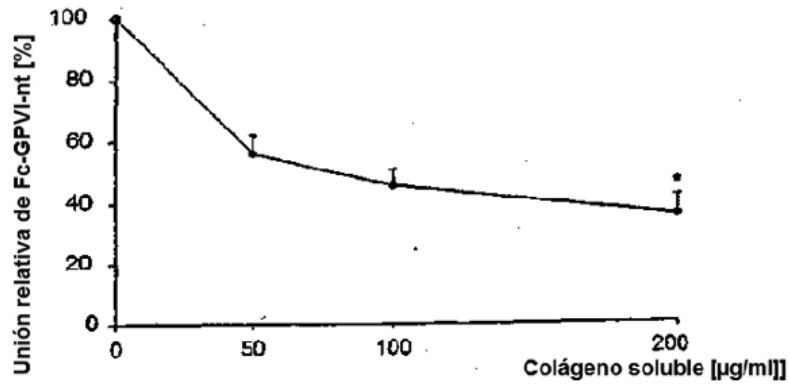
b



c



d



e

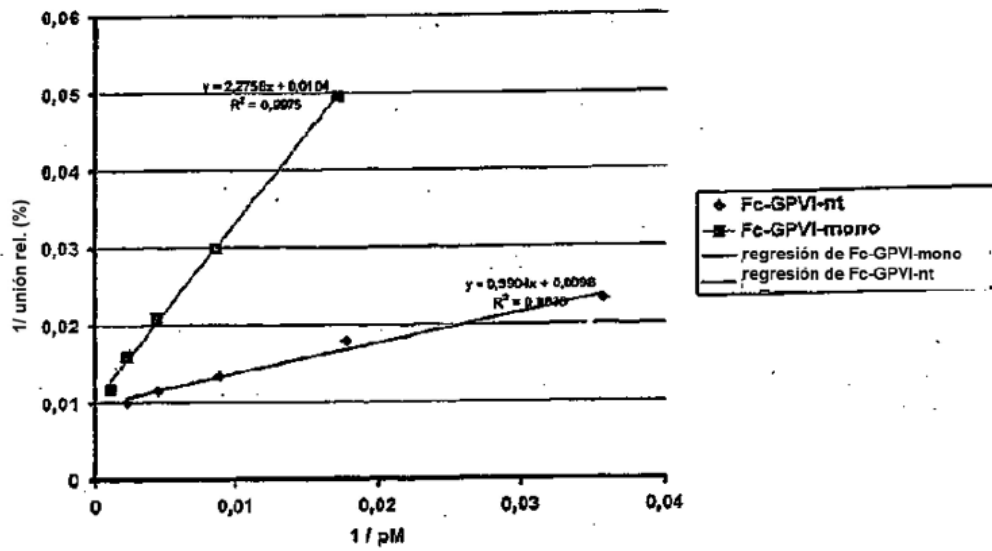


Figura 10

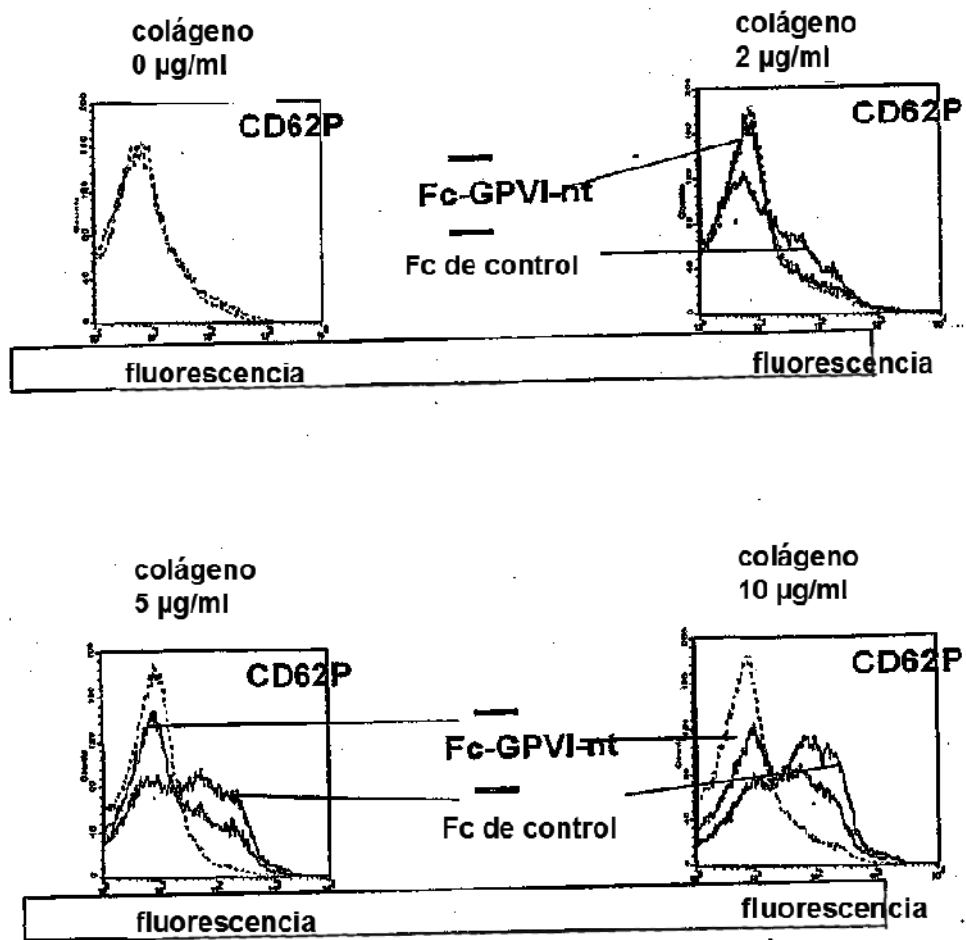
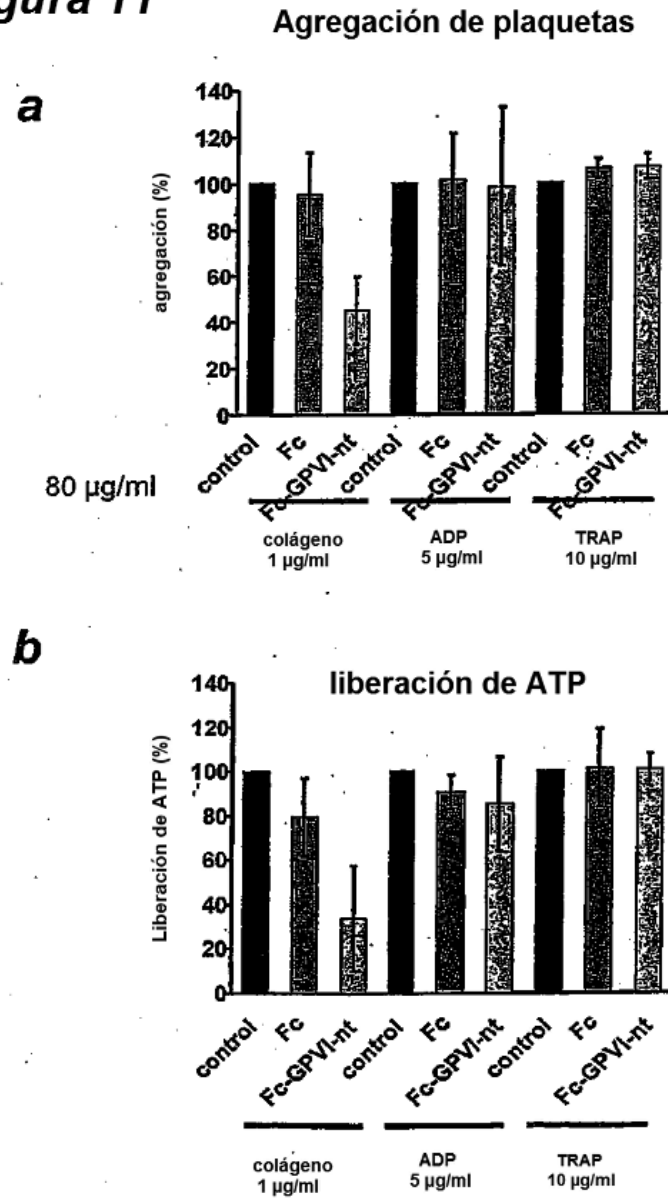


Figura 11



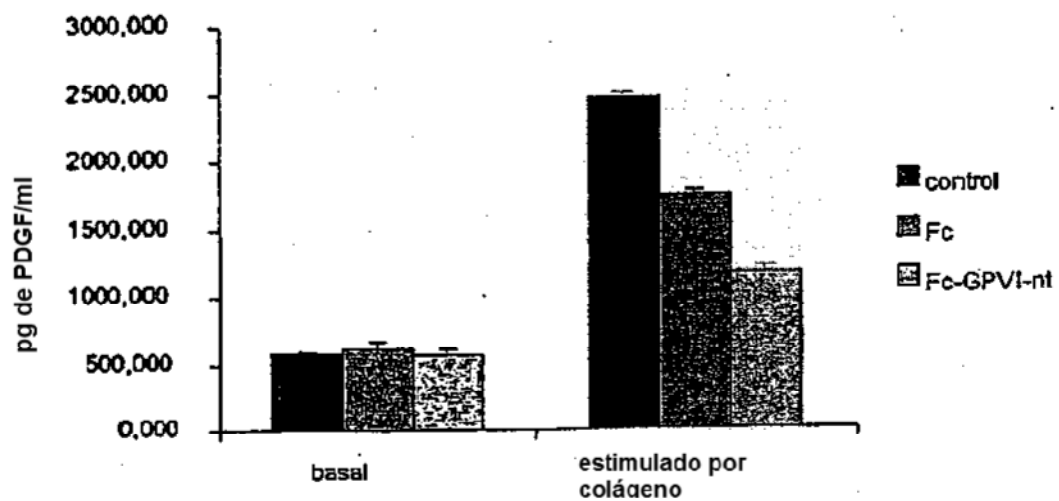
C**liberación de PDGF por plaquetas humanas**

Figura 12

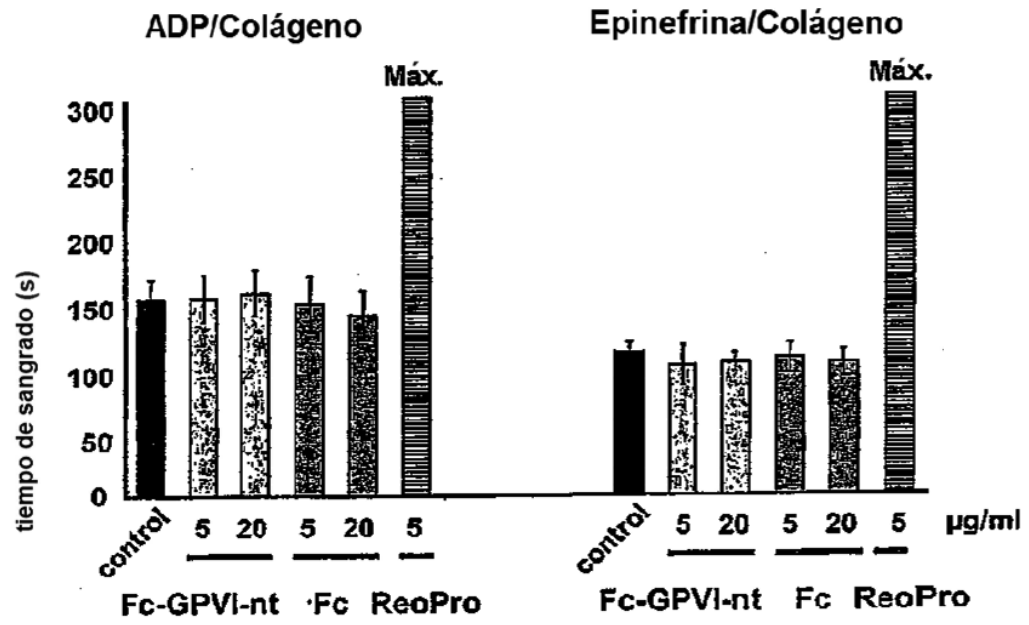


Figura 13

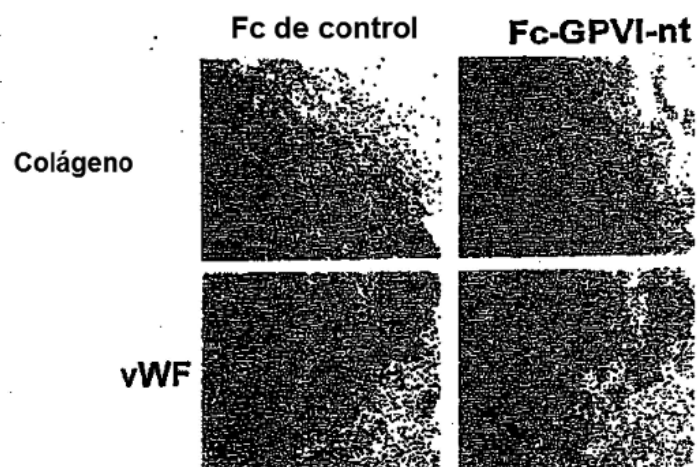
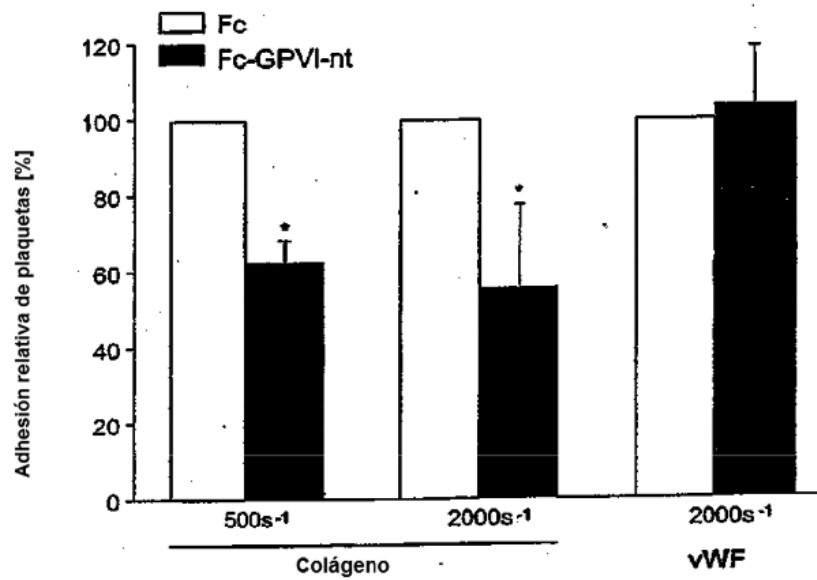
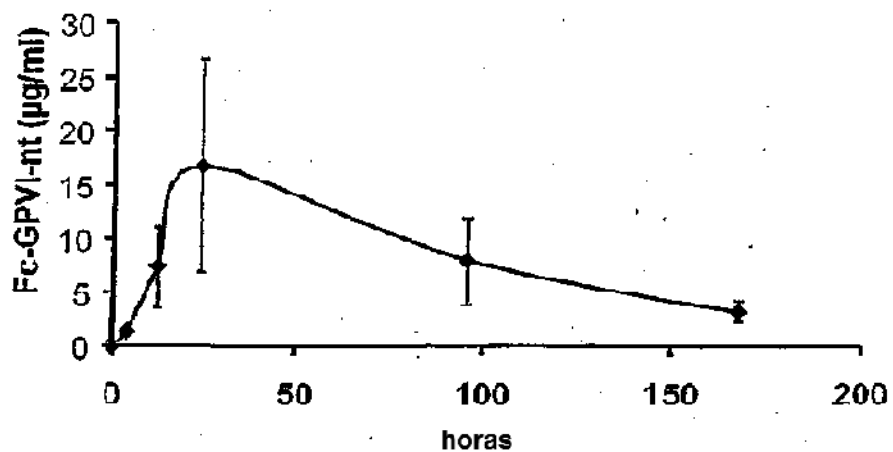
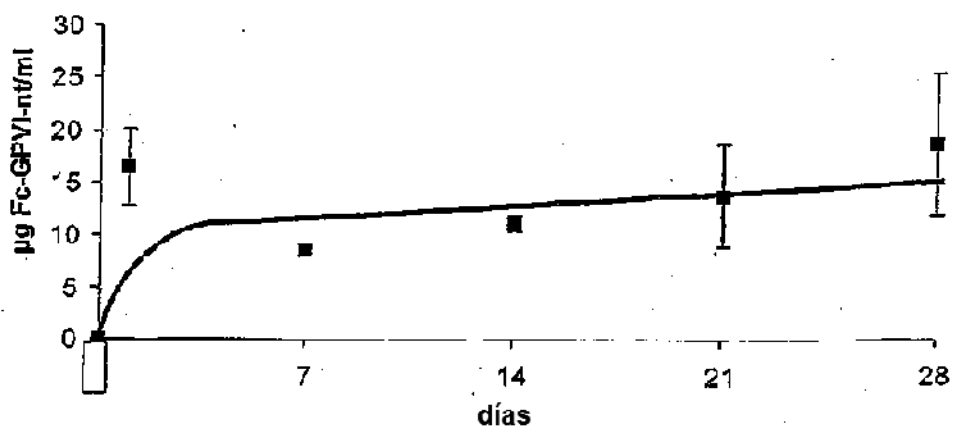


Figura 14**a****Monodosis farmacocinética de Fc-GPVI-nt****b****Dosis repetida farmacocinética de Fc-GPVI-nt**

C

Farmacocinético IV en ratones

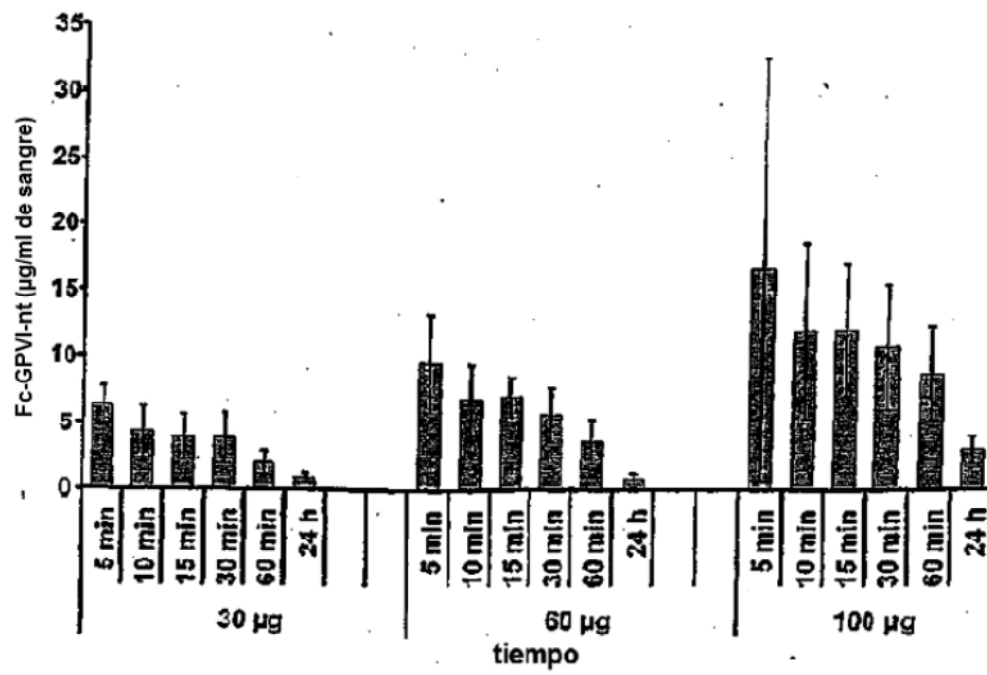
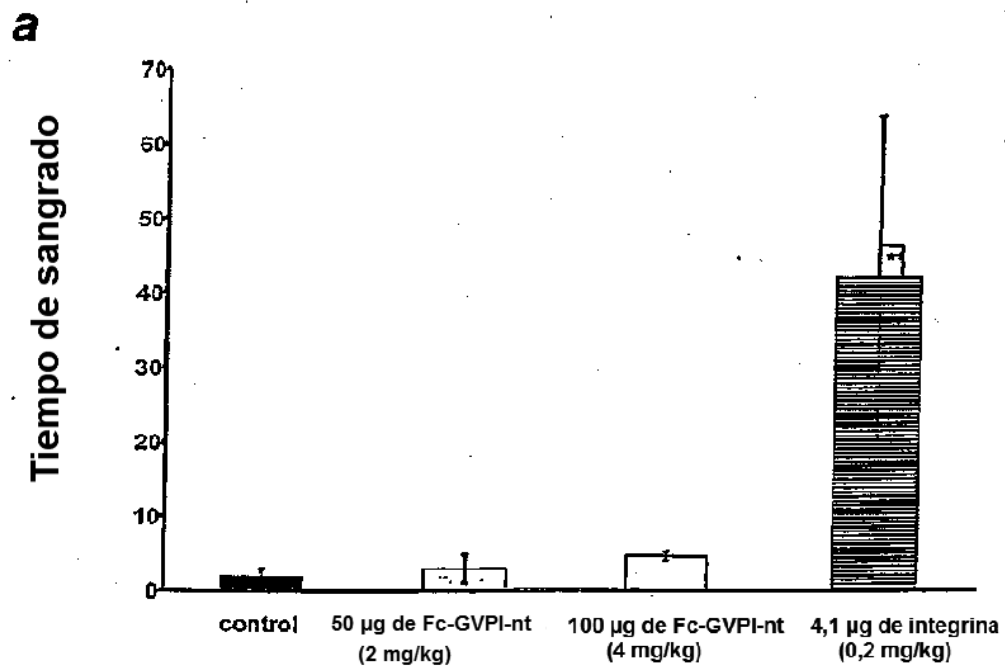
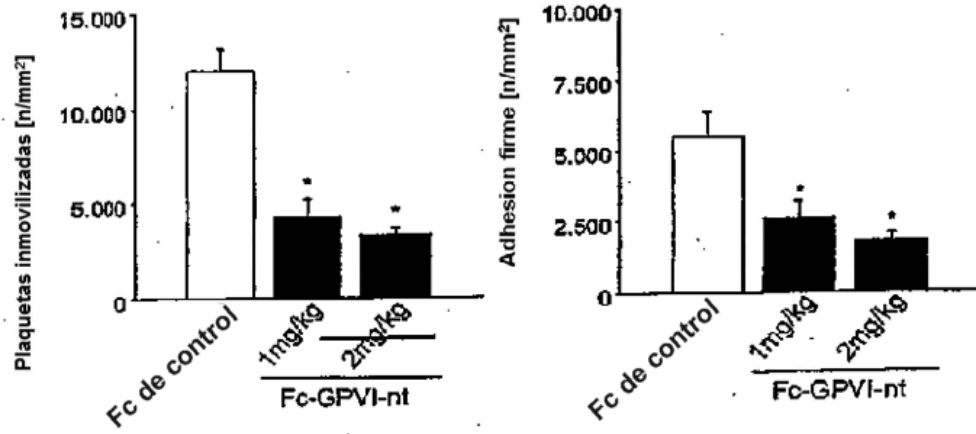
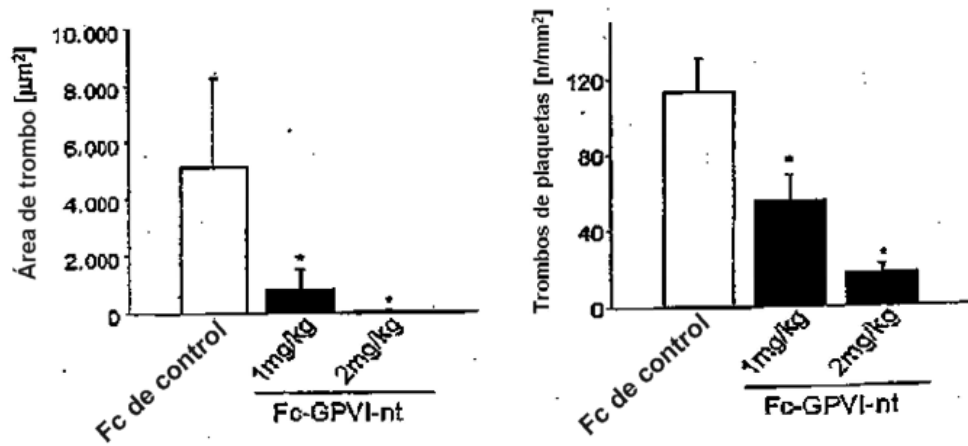


Figura 15

b



c



d



e



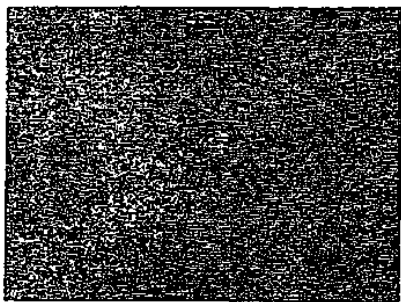
Fc



Fc-GPVI-nt

f

Fc



Fc-GPVI-nt



Figura 16

Fc-GPVI-nt



Fc



Figura 17

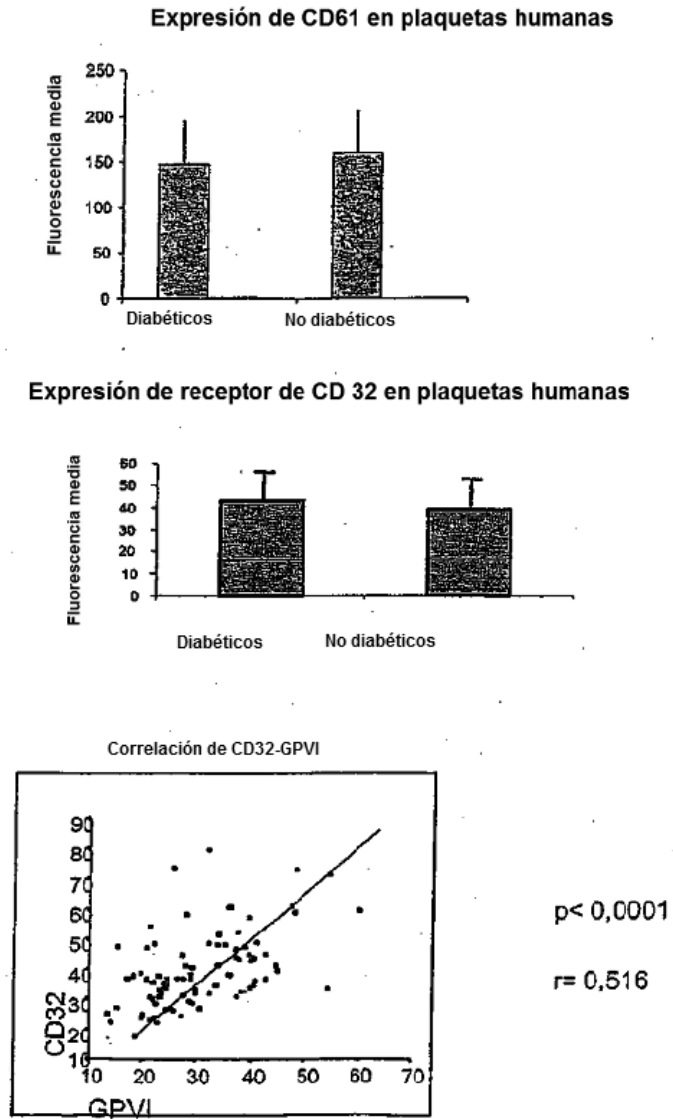


Figura 18

MSPSPTALFCLGLCLGRVPAQSGPLPKFSLQALPSSLYPLEKPYTLRCQGPPGVDLYRLEKLSSSRYYQDQ
 AVLFIPIAMKRSLAGRYRCSYQNGSLWSLPSDQLELVATGVFAKPSLSAQPGPAVSSGGDVTLCQTRYG
 FDQFALYKEGDPAPYKQPERWYRASFPITVTAHSGTYRCYSFSSRDPYLWSAPSDPLELVVTGTSVTP
 SRLPTEPPSSVAEFSEATAELTVSFTNKVFTTETSRGITTSPKESDSPAOPARQYYTKNGG/PAPELLGG
 PSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPG
 K