

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 652**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2000 E 11001216 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2341141**

54 Título: **Anticuerpos contra la glicoproteína VI para el receptor de colágeno de plaquetas recombinante**

30 Prioridad:

07.05.1999 EP 99109094

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(100.0%)**

**Industriepark Höchst, Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main , DE**

72 Inventor/es:

CLEMENTSON, KENNETH J.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 534 652 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

Anticuerpos contra la glicoproteína VI para el receptor de colágeno de plaquetas recombinante

La invención se refiere a la glicoproteína VI (GPVI), a su aislamiento, purificación, y a métodos para la producción recombinante. Especialmente, la invención se refiere al uso de GPVI, preferiblemente GPVI recombinante, en el tratamiento de trastornos y sucesos patológicos correlacionados directa o indirectamente con trastornos de la coagulación sanguínea, tales como enfermedades tromboticas y cardiovasculares. La proteína recombinante extracelular también se puede usar para establecer ensayos de cribado para encontrar inhibidores potenciales de la GPVI unida a la membrana con el fin de inhibir la interacción de los trombocitos y el colágeno.

La glicoproteína VI es una glicoproteína de la membrana plaquetaria de 62/65 kDa (no reducida/reducida respectivamente), que forma un complejo junto con la subunidad común Fc γ . La subunidad GPVI contiene el sitio de unión con el colágeno, y la subunidad Fc γ es responsable de la señalización. El complejo forma uno de los principales receptores de colágeno en la superficie de las plaquetas, crítico para la activación plaquetaria en respuesta al colágeno. La secuencia de reconocimiento en el colágeno consiste en secuencias de (GlyProHyp) $_n$. Se conocen pacientes de Japón que tienen una deficiencia genética de GPVI. Tienen leves problemas de hemorragia, y sus plaquetas responden sólo débilmente al colágeno, presumiblemente mediante otros receptores. Se ha aprendido mucho acerca de las cascadas de señalización que se originan en la GPVI, las cuales se parecen mucho a las de receptores inmunitarios, incluyendo receptores de linfocitos T, receptores de células B y receptores de células asesinas naturales. Estas cascadas implican la familia src de tirosina cinasas tales como Fyn y Lyn, así como p72^{SYK} y muchas otras tirosina cinasas y fosfatasa, y proteínas adaptadoras tales como LAT. Una diana principal de estas cascadas es la activación de la fosfolipasa Cy2 que desdobla fosfolípidos para dar los segundos mensajeros diacilglicerol e IP $_3$. Se piensa que la GPVI está implicada en la activación de la integrina plaquetaria α_2B_1 , que tiene un papel principal en la adhesión de las plaquetas a la pared de los vasos dañados. Los ratones con la subunidad Fc γ "eliminada genéticamente" tienen plaquetas que aún muestran respuestas al colágeno, implicando que el estado de reposo de α_2B_1 también puede ser regulado por el complejo GPVI/Fc γ .

La GPVI del receptor de colágeno plaquetario está estrechamente relacionada con los receptores activadores asesinos naturales de la familia p58KAR.

La adhesión y activación de plaquetas en reposo, circulantes, en un sitio de lesión vascular es la primera etapa en un proceso que conduce a la formación de un trombo, que se convierte en un tapón hemostático. El colágeno es uno de los componentes principales de la pared de los vasos, responsable de la activación de las plaquetas. Existen muchos tipos de colágeno, y siete de éstos se encuentran en las capas subendoteliales. Se han identificado en las plaquetas varios receptores diferentes para el colágeno, pero se considera ahora que los principales son la integrina α_2B_1 y la GPVI no integrina. Aunque la α_2B_1 está bien caracterizada y ambas subunidades se clonaron y secuenciaron hace varios años, la estructura de la GPVI ha permanecido difícil de averiguar, aunque se han identificado varios rasgos. Se determinó, hace aproximadamente veinte años, que la GPVI es una glicoproteína plaquetaria importante con una masa molecular en el intervalo de 60-65 kDa y un pl ácido. Su papel como receptor de colágeno putativo fue establecido después de la identificación de un paciente en Japón con un trastorno de hemorragia leve cuyas plaquetas mostraban un defecto específico de respuesta al colágeno y carecían de este receptor. Este paciente había desarrollado también autoanticuerpos para el receptor deficiente, y se usaron éstos para caracterizar la molécula adicionalmente. Más recientemente, se estableció que la GPVI está asociada de manera no covalente con la subunidad común Fc γ , la cual actúa como la parte señalizadora del complejo. También se demostró que la secuencia de reconocimiento en el colágeno para la GPVI es un triplete Gly-Pro-Hyp repetido dentro de la estructura helicoidal triple del colágeno, y que se podrían usar péptidos sintéticos basados en esta estructura como agonistas específicos dirigidos a la GPVI. Se mostró que el complejo GPVI/Fc γ señala hacia el interior de las plaquetas mediante un mecanismo similar a un receptor inmunitario, que implica la activación de p72^{SYK} y que conduce mediante una cascada de interacciones cinasa/fosfatasa/proteína adaptadora a la activación de PLCy2 y por tanto a la liberación de gránulos y agregación plaquetaria. Una etapa adicional en la caracterización de esta molécula fue la demostración de que la lectina de tipo C de serpiente, convulxina, de la Serpiente de Cascabel Tropical, *Crotalus durissus terrificus*, fue capaz de activar plaquetas agrupando GPVI mediante una interacción multimérica. Se mostró que la convulxina se une de manera específica a la GPVI, proporcionando un método para la purificación de este receptor junto con los enfoques establecidos.

Sugiyama et al. (Blood 69 (1987) 1712-1720) describen un nuevo factor agregador de plaquetas. Este factor se ha encontrado en un paciente con trombocitopenia autoinmunitaria. El factor es el IgG del paciente o sus fragmentos Fab o F(ab) $_2$. Los fragmentos F(ab) $_2$ indujeron agregación irreversible en plasma normal rico en plaquetas. Además, los fragmentos Fab inhibieron específicamente la agregación inducida por colágeno y por el IgG del paciente. El componente principal de un inmunoprecipitado obtenido con el IgG del paciente a partir de proteínas de membrana radiomarcadas de extracto plaquetario normal tuvo un peso molecular de 62 kDa.

Sugiyama et al. (International Journal of Hematology 58 (1993) 99-104) examinaron el papel funcional de P62, el antígeno reconocido por el fragmento Fab de IgG aislado del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria. Se describe que la plaqueta del paciente mostró adherencia normal a colágeno, y que el fragmento Fab inhibió la adhesión plaquetaria normal a colágeno de una manera dependiente de la dosis.

Ichinohe et al. (The Journal of Biological Chemistry 270 (1995) 28029-28036) examinaron el papel de la proteína GPVI usando los fragmentos F(ab)₂ del IgG del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria. El acoplamiento de GPVI se acopla a la activación de c-Src y Syk, insensible a cAMP, acompañado de fosforilación de tirosina de numerosos sustratos, incluyendo fosfolipasa C-γ2, de una manera similar a la estimulación de colágeno.

- 5 Gibbins et al. (FEBS Letters 413 (1997) 255-259) describen que GPVI es el receptor de colágeno en plaquetas que acopla la estimulación de plaquetas por colágeno a la fosforilación tirosínica de la cadena γ del receptor de Fc. Los autores usan fragmentos F(ab)₂ anti-GPVI del IgG del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria.

- 10 Jandrot-Perrus et al. (The Journal of Biological Chemistry 272 (1997) 27035-27041) describen la adhesión y activación de plaquetas humanas inducidas por convulxina. La adhesión y activación implica GPVI e integrina alfa2beta1. La exocitosis y agregación plaquetarias inducidas por convulxina se inhibieron por los fragmentos Fab del IgG del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria.

- 15 Ezumi et al. (The Journal of Experimental Medicine 188 (1998) 267-276) investigaron la implicación de la familia de Src en las señales proximales a través del complejo GPVI-FcR_γ usando convulxina y fragmentos F(ab)₂ anti-GPVI del IgG del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria. Los resultados indicaron que la familia de Src desempeña un papel crítico en la activación plaquetaria vía el complejo del receptor de colágeno GPVI-FcR_γ.

Heemskerk et al. (Thrombosis and Haemostasis, Schattauer GmbH 81 (1999) 782-792) describen la función de GPVI e integrina alfa2beta1 en la respuesta procoagulante de plaquetas adherentes a colágeno individuales. Los autores usan IgG anti-GPVI y los fragmentos Fab correspondientes del IgG del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria.

- 20 Ishibashi et al. (International Journal of Hematology 62 (1995) 107-115) identificaron la molécula 2 de adhesión intercelular (ICAM-2) usando el anticuerpo del paciente con trombocitopenia autoinmunitaria en una técnica de inmunoprecipitación mejorada. La molécula ICAM-2 tiene un peso molecular de alrededor de 62 kDa.

- 25 El documento EP 0.896.002 se refiere a proteínas quiméricas que consisten en una integrina y una inmunoglobulina, a sus complejos heterodímeros, a un procedimiento de producción de las mismas y a sus aplicaciones como fármacos y reactivos. Además, el documento EP 0.896.002 se refiere a la aplicación médica de la proteína quimérica integrina-inmunoglobulina como sustituto de las plaquetas. Las integrinas son moléculas que pertenecen a la superfamilia de integrinas. Las cadenas alfa incluyen 15 cadenas alfa, entre otras, alfa1. Las cadenas beta incluyen ocho cadenas beta, entre otras, beta1. Se encontró que un complejo heterodímero de proteína quimérica integrina alfa2beta1-inmunoglobulina tiene capacidad de unión a la matriz extracelular. Por lo tanto, se puede usar como agente terapéutico o preventivo frente a la tendencia hemorrágica congénita y adquirida debido a anomalía plaquetaria, y también ampliamente como sustituto de transfusión de plaquetas. Además, el complejo heterodímero de proteína quimérica integrina alfa2beta1-inmunoglobulina puede ser un agente terapéutico o preventivo para condiciones de enfermedades en las que el trastorno de células endoteliales vasculares es un problema.

- 35 Por tanto, está claro a partir de la técnica anterior que la GPVI parece ser un compuesto muy interesante en muchos campos terapéuticos, sobre todo concernientes a aplicaciones que están relacionadas, hablando en general, directa o indirectamente, con sucesos de coagulación sanguínea que dependen de la interacción colágeno - plaqueta. Fue, por tanto, una meta de la presente invención proporcionar GPVI en una forma recombinante y mostrar su eficacia como diana terapéutica directa o como herramienta para el cribado de compuestos cortos, especialmente compuestos sintetizados o sintetizables químicamente que tienen la capacidad de inhibir o bloquear la interacción natural plaqueta-colágeno.

40 Fue otra meta de la presente invención proporcionar anticuerpos anti-GPVI.

En vista de esto, la presente invención se refiere a un antisuero anti-GPVI policlonal, a un Fab anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, o a un F(ab')₂ anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, en el que GPVI tiene la secuencia de SEC ID NO:3.

- 45 La presente invención también se refiere a un antisuero anti-GPVI policlonal, a un Fab anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, o a un F(ab')₂ anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI como se describe anteriormente, en el que GPVI se puede obtener a partir de plaquetas usando aglutinina de germen de trigo y convulxina y aplicando electroforesis en gel sobre poliacrilamida de alrededor de 8,5%.

- 50 La presente invención se refiere además a un antisuero anti-GPVI policlonal, a un Fab anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, o a un F(ab')₂ anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI como se describe anteriormente, en el que el antisuero anti-GPVI policlonal se genera en conejos.

Además, la presente invención se refiere a un fragmento Fab anti-GPVI de anticuerpos monoclonales de ratón humanizados frente a GPVI, en el que GPVI tiene la secuencia de SEC ID NO: 3.

- 55 La presente invención también se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen la región N-terminal de GPVI, en el que GPVI tiene la secuencia de SEC ID NO: 3.

La invención describe porciones o fragmentos de la proteína GPVI que han mantenido su actividad biológica, la cual es la unión al colágeno.

5 La invención tuvo éxito en la purificación de cantidades adecuadas de GPVI para su caracterización preliminar y para la secuenciación peptídica. Las secuencias se usaron para diseñar cebadores para PCR para identificar una secuencia positiva en una librería de ADN. Esta secuencia de ADN se usó después como sonda para aislar una secuencia de ADN casi completa de la librería y se obtuvo la secuencia 5' faltante usando un método RACE a partir de una librería de ADN de plaquetas.

10 La invención también tuvo éxito en mostrar el uso de GPVI recombinante como compuesto terapéuticamente aplicable que es capaz, cuando se administra a un paciente con, por ejemplo, vasos sanguíneos dañados, de unirse al colágeno, impidiendo así que los trombocitos que llevan GPVI unida a la membrana se unan a dicho colágeno. El dominio extracelular soluble recombinante de la GPVI contiene el sitio de unión con el colágeno y puede impedir la activación de las plaquetas por el colágeno. Podría, por lo tanto, ser aplicable al tratamiento de estados de enfermedad que impliquen una activación incrementada de las plaquetas con el colágeno, tal como la rotura de la placa aterosclerótica, en enfermedades tales como angina inestable o durante tratamiento quirúrgico, tal como la Angioplastia Coronaria Transluminal Percutánea (PTCA), en la que las arterias son reabiertas por el inflado de un catéter de globo causando un daño considerable a la pared vascular y mucha activación plaquetaria, y dando como resultado a menudo el cierre nuevamente del vaso posteriormente. La ventaja de los fragmentos de GPVI recombinante en comparación con los métodos de tratamiento actuales es que actúan en una etapa más temprana impidiendo o reduciendo la activación plaquetaria en vez de suprimir los sucesos después de la activación plaquetaria, tales como la agregación mediante antagonistas de GPIIb-IIIa. Así, se liberan cantidades más pequeñas de los contenidos de los gránulos plaquetarios, incluyendo factores de crecimiento y quimiocinas, que están implicados no sólo en la reparación de heridas sino en la remodelación de la pared vascular por migración del músculo liso y en la atracción de células fagocíticas tales como monocitos, que se sabe que contribuyen a la aterosclerosis. Se podría usar el fragmento Fab de anticuerpos monoclonales de ratón humanizados contra la GPVI con un efecto similar para bloquear la GPVI en la superficie de las plaquetas con similares aplicaciones que las anteriores.

30 La GPVI recombinante como se describe aquí también se puede usar en un ensayo de unión al colágeno para cribar moléculas pequeñas (en librerías combinatorias por ejemplo) capaces de inhibir esta interacción y que se pueden usar para desarrollar compuestos terapéuticos que son inhibidores de la interacción colágeno-plaqueta. Mediante una derivatización adecuada, estos compuestos se hacen disponibles por vía oral. De nuevo, el principal objetivo es preparar compuestos que reduzcan las interacciones GPVI-colágeno y por tanto la activación de las plaquetas en situaciones donde las plaquetas entran en contacto con el colágeno. La tecnología de cribado como tal usada en esta invención está bien establecida en la técnica anterior. Mediante tales ensayos de cribado, la invención permite encontrar y desarrollar nuevas dianas que pueden inhibir la GPVI natural unida a la membrana en la superficie de los trombocitos como antagonista del colágeno. Tales dianas, las cuales pueden ser moléculas químicas cortas, pueden ser entonces la base para invenciones posteriores.

40 Otra aplicación principal de la GPVI y reactivos que reconocen dominios específicos de la GPVI es como marcadores de la edad y funcionalidad de las plaquetas. Se piensa generalmente que las plaquetas jóvenes son más activas y funcionales que las más viejas. Las plaquetas jóvenes se unen a y son activadas por la lectina de tipo C de veneno de serpiente convulxina, que es específica para la GPVI, y según envejecen disminuyen tanto la unión como el grado de activación. Esto puede ser debido a cambios bien proteolíticos o bien conformacionales en la GPVI o su asociación con Fcy debido a la activación de las plaquetas o un daño en la circulación. Este puede ser un parámetro útil para medir el perfil de edad y función de las plaquetas en pacientes, así como en personas normales, durante controles médicos. El perfil de edad de las plaquetas cambia en muchas enfermedades que afectan a la médula ósea o al sistema inmunitario, y podría ser un criterio de diagnóstico importante si estuvieran disponibles métodos mejores para su determinación. Por ejemplo, los pacientes con enfermedades que implican un recambio de plaquetas incrementado mostrarán más plaquetas jóvenes, mientras que los pacientes en tratamiento de quimioterapia o radiación mostrarán una población que envejece continuamente. De este modo, se puede usar tal perfil de edad para una monitorización precisa del tratamiento. En una población sana normal se sabe muy poco acerca de la distribución del perfil de edad y su papel como pronosticador de cambios en la salud. En la actualidad se usa el naranja de tiazol para detectar plaquetas reticuladas jóvenes que contienen ARNm. Este ARNm se descompone pronto, restringiendo el método solamente a las plaquetas más jóvenes. Los reactivos que se podrían usar en tal ensayo incluirían proteínas de veneno de serpiente específicas para la GPVI, tales como convulxina, o anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen la región N-terminal de la GPVI, o anticuerpos monoclonales que reconocen nuevos sitios o conformaciones expuestas por proteolisis del dominio N-terminal o conformaciones específicas presentes bien en la molécula intacta y no en la envejecida o bien viceversa. Estos reactivos serían marcados con un marcador fluorescente, o junto con un segundo anticuerpo o reactivo de afinidad marcado fluorescente, y se usarían en citometría de flujo para medir el perfil de unión de las plaquetas. En una fase más tardía alternativa, se podrían adoptar técnicas de medición menos laboriosas basadas en una medición automatizada de perfiles plaquetarios. Usar métodos de clasificación celular con citometría de flujo o perlas magnéticas, debe ser posible aislar plaquetas jóvenes y viejas para examinar los factores implicados en la eliminación de las plaquetas viejas de la circulación.

La presente invención describe un ADN que codifica la Glicoproteína VI o ss fragmentos biológicamente activos, especialmente la secuencia de la Fig. 2.

La presente invención describe además un ADN que codifica la Glicoproteína VI que comprende la secuencia de aminoácidos de la Fig. 1.

5 La presente invención describe una composición farmacéutica que comprende GPVI recombinante junto con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para ella, y su uso para la fabricación de un medicamento en el campo terapéutico de sucesos y trastornos tromboticos y cardiovasculares relacionados con interacciones plaqueta-colágeno.

10 La presente invención describe el uso de GPVI recombinante en una herramienta de cribado para detectar inhibidores específicos de las interacciones plaqueta-colágeno. Las posibles indicaciones y aplicaciones médicas, respectivamente, son, por ejemplo, la angina de pecho inestable, la PTCA, el uso de endoprótesis vasculares en este campo, las operaciones en vasos coronarios, las operaciones generales en vasos sanguíneos, las operaciones que pueden dañar vasos sanguíneos más grandes, tales como operaciones de la articulación de la cadera. Además, están incluidas todas las indicaciones que se refieran a sucesos tromboembólicos causados por trastornos de la interacción entre la pared del vaso y el sistema de coagulación con un alto riesgo de formación de trombos y bloqueo de vasos.

Como se indicó anteriormente, la proteína GPVI y los fragmentos de la misma son adecuados como compuestos farmacéuticamente eficaces en composiciones y combinaciones farmacéuticas.

20 Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente ingredientes activos adicionales, como anticoagulantes tales como hirudina o heparina, o agentes trombolíticos tales como activador del plasminógeno o hementina.

25 La nueva proteína, y sus fragmentos activos biológicos, respectivamente, pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con cualquier ácido orgánico o inorgánico no tóxico. Los ácidos inorgánicos son, por ejemplo, el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico o fosfórico y sales ácidas de metales, tales como monohidrogenoortofosfato de sodio e hidrogenosulfato de potasio. Los ejemplos para ácidos orgánicos son los ácidos mono-, di- y tricarbónicos tales como acético, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaléico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinámico, salicílico, y ácidos sulfónicos tales como el ácido metanosulfónico. Las sales del resto de aminoácido carboxiterminal incluyen las sales no tóxicas de ácidos carboxílicos formadas con cualesquiera bases inorgánicas u orgánicas adecuadas. Estas sales incluyen, por ejemplo, metales alcalinos tales como sodio y potasio, metales alcalino-térreos tales como calcio y magnesio, metales ligeros del Grupo IIIA, incluyendo aluminio, y aminos orgánicas primarias, secundarias y terciarias tales como trietilaminas, incluyendo trietilamina, procaína, dibencilamina, 1-etenamina, N,N'-dibenciletildiamina, dihidroabietilamina y N-alquilpiperidina. Como se usa aquí, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material de carga, diluyente o material encapsulante sólido o líquido, no tóxico, inerte, que no reacciona de manera adversa con el compuesto activo o con el paciente. Se conocen bien en la técnica vehículos adecuados, preferiblemente líquidos, tales como agua estéril, disolución salina, dextrosa acuosa, disoluciones de azúcar, etanol, glicoles y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral.

40 Las formulaciones se pueden administrar como dosis unitarias que contienen los excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, convencionales, que son típicos para la administración parenteral.

45 El término "parenteral" incluye en la presente memoria técnicas de inyección e infusión subcutánea, intravenosa, intraarticular y intratraqueal. También son adecuadas otras administraciones, tales como administración oral y aplicación tópica. Las composiciones y combinaciones parenterales se administran de manera más preferible por vía intravenosa, bien en una forma de bolo o bien como una fusión constante, según procedimientos conocidos. Los comprimidos y cápsulas para la administración oral contienen excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes formadores de comprimidos, lubricantes, disgregantes, y agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir según métodos bien conocidos en la técnica.

50 Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, como agentes suspensores, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes.

Las aplicaciones tópicas pueden estar en la forma de suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jaleas o preferiblemente pomadas en emulsión.

55 Las dosis unitarias pueden contener las cantidades requeridas diariamente de la proteína según la invención, o submúltiplos de las mismas para componer la dosis deseada. La dosis óptima terapéuticamente aceptable y la frecuencia de la dosis para un paciente dado (mamíferos, incluyendo seres humanos) dependen de una variedad de

factores, tales como la actividad del material activo específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, velocidad de aclaramiento, el objeto del tratamiento, es decir, terapia o profilaxis, y la naturaleza de la enfermedad trombótica a tratar, la actividad antiplaquetaria o anticoagulante.

5 Por lo tanto, en composiciones y combinaciones útiles como anticoagulantes en un paciente tratado (in vivo), una dosis diaria farmacéuticamente eficaz de los péptidos de esta invención está entre alrededor de 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal. Según la forma de aplicación, una dosis única puede contener entre 0,5 y 10 mg del inhibidor de trombina. Para conseguir un efecto anticoagulante en sangre extracorpórea, una cantidad farmacéuticamente eficaz de los péptidos inventivos está entre 0,2 y 150 mg/l, preferiblemente entre 1 mg y 20 mg/l de sangre extracorpórea.

10 Descripción detallada de la invención

Se eligieron dos secuencias de 7 aminoácidos que mostraban la degeneración mínima en el código genético para la síntesis de cebadores de ADN, con el fin de amplificar parte del ADNc de la GPVI por PCR. Como la ubicación de ambos péptidos en la proteína era totalmente desconocida, para cada uno de ellos, se prepararon dos cebadores degenerados, uno sentido y uno antisentido. Estos cebadores se usaron para amplificar una librería de médula ósea humana. La combinación del cebador 5'TYA THC CNG CNA TGA ARMG 3' sentido que codifica la secuencia PAMKRSL con el antisentido 5'TTR TAN ARN GCR AAY TGR TC 3' que corresponde a DQFALYK amplificó un fragmento de ADN de 221 pb. Además de los péptidos seleccionados, el ADN amplificado codificó el péptido LysC/AspN DQLELVATGVFAKPSLSAQPGPAVSS, que enlaza claramente la secuencia al ADNc para la GPVI.

15 El cribado de 600.000 pfu de una librería de médula ósea con este fragmento de ADN de 221 pb produjo 4 pfu positivas. Tres tenían insertos de 1350 pb ya fueran cortados por la enzima de restricción Sal I o por EcoR I y pertenecían a la superfamilia de IgG. El cuarto tenía un inserto de 4,6 kb por digestión con Sal I y dio dos fragmentos de 2300 pb y 1300 pb respectivamente cuando se trataron por EcoR I. Su ADN contuvo la secuencia para los 10 péptidos derivados de la secuenciación de aminoácidos de la GPVI pero se detuvo cerca del terminal amino. No se pudo encontrar metionina de partida o secuencia líder, pero estaban presentes más de 2000 pb de ADN no del marco de lectura secuenciado previamente que terminaba en una secuencia Alu. El experimento RACE del extremo 5' se completó en ARN poli A de plaqueta con cebadores ubicados en una parte de la secuencia de la GPVI que había sido corroborada por la de los péptidos. Un fragmento de 318 pb que incluye 70 bp nuevos y x pb en la secuencia de la cuarta por en pb 1987 correspondientes a 14 aminoácidos que incluyen la primera metionina se encontró antes de caer en la secuencia de GPVI establecida. De este modo, se pudo secuenciar un ADNc que contenía un total de 1249 pb y que codifica una proteína con un marco de lectura abierto que incluye la secuencia líder con 339 aminoácidos.

20 Un ADNc que codifica GPVI de plaquetas se clonó y secuenció a partir de una librería de ADNc de médula ósea humana usando RACE con ARNm de plaquetas para suministrar la secuencia 5' faltante. El marco de lectura abierto de 1017 pb codifica 339 aminoácidos y una región 3' no traducida. El análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos reveló la presencia de dos dominios transmembrana putativos, una secuencia señal de 23 aminoácidos putativa, y un dominio de 19 aminoácidos entre los restos 247 y 265 de la proteína madura. La secuencia y su traducción de aminoácidos se muestran en la Fig. 2 y la Fig. 1. Una comparación con la secuencia de aminoácidos de las moléculas más similares encontradas en una búsqueda de GenBank revela claramente que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y el dominio extracelular contiene dos bucles de dominio C2 de Ig formados por dos puentes de disulfuro. Es una molécula proteica que cruza la membrana de clase uno, con el término N en el exterior y atraviesa la membrana una vez. Las moléculas más estrechamente relacionadas pertenecen a la clase de los receptores asesinos naturales, que contiene tanto tipos inhibidores como activadores. La GPVI pertenece claramente a la subclase activadora, no sólo a través de su función sino también porque, a diferencia de la clase inhibidora, no contiene secuencias ITIM en su dominio citoplásmico. Tampoco contiene ningún resto de tirosina que pudiera estar implicado en la fosforilación. Hay algunos restos de treonina y serina en este dominio, pero no concuerdan con ningún criterio para secuencias de consenso de cinasas. Al igual que la clase activadora de receptores NK, la GPVI contiene un resto de arginina como tercer aminoácido del dominio que cruza la membrana, que está implicado en la formación del complejo con la subunidad Fcy. El dominio citoplásmico contiene 51 aminoácidos, mostrando solamente una pequeña similitud (en la región justo por debajo de la membrana) a los dominios citoplásmicos de otros miembros de esta familia. Esto sugiere que este dominio en la GPVI puede asociarse con diferentes tipos de molécula citoplásmica que los otros miembros de la familia. La GPVI contiene solamente un único sitio de N-glicosilación putativo en Asn69. El dominio justo por encima de la membrana antes de que comiencen las láminas beta del dominio Ig, sin embargo, es rico en restos de treonina y serina, los cuales podrían proporcionar sitios de O-glicosilación tales como los que se encuentran en la GPIIb α y GPV. La función principal de esta O-glicosilación parece ser presentar las estructuras del receptor bien extendidas desde la superficie de las plaquetas para facilitar las interacciones con sus ligandos voluminosos. Dado que GPVI fue establecida anteriormente como una sialoglicoproteína, la diferencia en masa molecular entre la masa de aminoácidos teórica (37 kDa) y la masa determinada por electroforesis en gel (65 kDa reducida) debe ser debida a esta glicosilación.

25 La estructura de los receptores asesinos naturales de los dos tipos de dominio ha sido establecida por estudios cristalográficos de rayos X, y se mostró que los dos dominios de Ig forman un ángulo agudo, encontrándose el sitio del receptor para los antígenos HLA que llevan péptidos en el exterior del codo. Una comparación directa de la

estructura del sitio de unión a los péptidos HLA con la del colágeno sugiere inmediatamente que estos receptores tienen un origen común, debido a que las estructuras alfa-helicoidales múltiples del sitio de unión a HLA y el péptido que contiene se asemejan mucho a la estructura de triple hélice del colágeno. Además, GPVI contiene múltiples secuencias de PGX, que podrían imitar una hebra de colágeno adicional en la interacción con una fibra de colágeno. Se ha postulado que los receptores asesinos naturales funcionan por un mecanismo de dimerización con dos receptores que reconocen dos sitios de HLA independientes en la célula que está investigando la célula asesina natural. Posiblemente, esta dimerización es parte del mecanismo de activación o desactivación, dependiendo de la clase de receptor. En el caso de GPVI, puede haber también la posibilidad de que dos moléculas de GPVI se asocien con un Fcy, dado que cada monómero del dímero Fcy tiene una secuencia de reconocimiento. Sin embargo, la estequiometría no es aún conocida, y en base a la estructura de colágenos, péptidos similares al colágeno que actúan mediante GPVI y convulxina, parece probable que la fuerza de la señal esté relacionada con el número de complejos GPVI/Fcy que están agrupados entre sí. Otros receptores plaquetarios que pertenecen a esa familia de Ig incluyen ICAM-2 (CD) y PECAM (CD31).

Todos los microorganismos, líneas celulares, sistemas de expresión, huéspedes de expresión, plásmidos, promotores, marcadores de resistencia, orígenes de replicación, sitios de restricción u otros fragmentos o partes de vectores que se mencionan en la descripción no directamente relacionados con la invención reivindicada están generalmente disponibles comercialmente o de otro modo. A no ser que se den otras alusiones, se usan solamente como ejemplos y no son esenciales con respecto a la invención, y pueden ser sustituidos por otras herramientas adecuadas y materiales biológicos, respectivamente.

Las técnicas que son esenciales de acuerdo con la invención se describen en detalle a continuación y anteriormente. Otras técnicas que no se describen en detalle corresponden a métodos estándar conocidos que son bien conocidos por un experto en la técnica, o se describen con más detalle en las referencias y solicitudes de patente citadas y en la bibliografía estándar (por ejemplo Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor; Harlow, Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales – La Proteína A-Sepharose, los anticuerpos de cabra antirratón y anticonejo conjugados con peroxidasa, la albúmina de suero bovino, el veneno de *Crotalus durissus terrificus*, la aglutinina de germen de trigo (WGA), la agarosa en perlas al 4% reticulada activada con cloroformiato de N-hidroxilsuccinamidilo, y Triton X-114 fueron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), octanoil-N-metil-glucamida (ONMG) y nonanoil-N-metil-glucamida (NNMG) fueron de OxyL Chemie (Bobingen, Alemania).

Ejemplo 2: Aislamiento de GPVI de las plaquetas - Las glicoproteínas de la membrana se aislaron de las plaquetas como se describe anteriormente. Brevemente, se lavaron plaquetas (de 40 capas leucoplaquetarias) y se lisaron en Triton X-114 al 2% en presencia de inhibidores de proteasa. El Triton X-114 y las fases acuosas se separaron, y la fase detergente se cargó en una columna de aglutinina de germen de trigo acoplada a Sepharose 4B. Las glicoproteínas plaquetarias se eluyeron con Tris HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 30 mM, octanoil-N-metilglucamida al 0,2% (ONMG) y N-acetilglucosamina al 2%. Después de diálisis y concentración, la disolución de glicoproteínas se cargó en una columna de convulxina unida a agarosa en perlas al 4% reticulada activada con cloroformiato de N-hidroxilsuccinamidil-p-nitrofenilo (1 mg/ml). La columna se lavó con 4 volúmenes de Tris HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 30 mM, nonanoil-N-metilglucamida (NNMG) al 0,2%, y después con 4 volúmenes de Tris HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 30 mM y NNMG al 2%. La GPVI se eluyó con SDS al 0,08% en Tris/HCl 10 mM, pH 7,4. Se concentró la disolución y se cargó en un gel preparativo de 8,5% de poli(acrilamida) usando el Model 491 Prep Cell (BioRad, CA). La electroforesis preparativa se realizó en condiciones no reducidas siguiendo las instrucciones del fabricante. La GPVI eluyó como una única banda a 65 kDa. Se reunieron las fracciones, se concentraron en Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) y se resuspendieron en Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 y ONMG al 0,1%.

Ejemplo 3: Análisis de aminoácidos de GPVI - Se digirió GPVI con las endoproteinasas LysC y AspN (Boehringer Mannheim, Alemania). Los 10 péptidos generados se separaron por HPLC de fase inversa y se secuenciaron en un secuenciador de proteínas de fase líquida pulsada Applied Biosystem modelo 477A con un analizador de aminoácidos de feniltiohidantoína en línea modelo 120A.

Ejemplo 4: Amplificación de un fragmento de 221 pb que codifica parte de GPVI a partir de una librería de ADNc λ gt 10 -

Se amplificó una muestra (10^{10} pfu) (unidades formadoras de placa) a partir de una librería de médula ósea humana (Clontech, Palo Alto, CA) usando 2 combinaciones de 4 cebadores degenerados. Las concentraciones finales de cebador fueron 2 μ M, la concentración de dNTP fue 200 μ M, y se usaron 2 U/100 μ l de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer, Rotkreuz, Suiza) de reacción. Las condiciones de la PCR fueron 5 ciclos a 37°C seguido de 30 ciclos a 44°C. El 19mer sentido 5' TYATHCCNGCNATGAARMG 3' y el 20mer antisentido 5' TTRTANARNGCRAAYTGRTC 3' amplificaron un fragmento de 221 pb que se subclonó en Bluescript KS⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) y se secuenció usando el kit T7 Sequenase (Amersham, Suiza).

- 5 **Ejemplo 5:** Cribado de la librería de ADNc de λ gt 11 con la sonda de GPVI de 221 pb - El fragmento de 221 pb se cortó del plásmido, se limpió y se marcó con $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (20 MBq/50 μl , Hartmann Analytik, Braunschweig, Alemania) usando el kit High Prime Labelling (Boehringer Mannheim, Suiza). La librería de médula ósea humana se cribó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hicieron crecer fagos positivos, se aisló su ADN y se subclonó en BlueScript usando sitios EcoRI o Sal I y se secuenció. La secuenciación se llevó a cabo usando el sistema ABS de RACE- se preparó poli A ARN de plaquetas como se describió anteriormente (). La transcripción inversa (30 μl) se llevó a cabo usando 5 μg de poli A ARN con el cebador 5'TGAATGAGACGGTCAGTTCAGC 3' (20 μM), dNTP (1 mM), RNAsin (40 U), tampón 1X AMV y 20 U de transcriptasa inversa de AMV durante 20 min a 45°C, seguido de 20 min a 52°C. La mezcla de reacción se trató con 2 μl de NaOH 6N a 65°C durante 30 min, se neutralizó con 2 μl de ácido acético 6N, y se concentró en un Centricon 30 (Amicon). Se ligó un anclaje al ADN de primera hebra siguiendo el protocolo de Aptes y Siebert () BioTechniques 15: 890-893, (1993). La PCR anidada se llevó a cabo usando un cebador complementario al anclaje y el cebador 5' TTGTACAGAGCAAATTGGTC 3' (35 ciclos, 55°C) y seguido del cebador 5' GACCAGAGGCTCCGTTCTG 3' (30 ciclos a 53°C). La banda más elevada (350 bp) se separó por electroforesis en agarosa de las más bajas, se subclonó en BlueScript, y se secuenció.
- 10
- 15 **Ejemplo 6:** Preparación de Fab y F(ab')₂ anti-GPVI - Se generaron en conejos antisueros policlonales contra GPVI humana. La IgG de antisuero de conejo anti-GPVI se purificó como se describió. La digestión de IgG con papaína inmovilizada (Pierce) para generar fragmentos Fab se llevó a cabo según el protocolo estándar del proveedor. Los fragmentos Fab se separaron de IgG sin digerir y de fragmentos Fc usando una columna de Proteína A inmovilizada (Sigma). El efluente se transfirió a un tubo de diálisis, se concentró usando polietilenglicol sólido 20.000, se dializó completamente contra Hepes 20 mM, NaCl 140 mM, KCl 4 mM, pH 7,4, y se almacenó a 4°C hasta su uso. Se prepararon fragmentos F(ab')₂ por digestión de IgG con pepsina, relación enzima a sustrato 1:50 (p/p), en tampón de acetato 0,5 M, pH 4,0, a 37°C durante 18 h. El pH se corrigió hasta 7,4 con NaOH diluido, y la muestra se dializó contra fosfato 20 mM, pH 7,4. Se separaron fragmentos F(ab')₂ de la IgG sin digerir y de los fragmentos Fc usando cromatografía con Proteína A. El efluente se transfirió a un tubo de diálisis, se concentró usando polietilenglicol sólido 20 000, se dializó intensamente contra Hepes 20 mM, NaCl 140 mM, KCl 4 mM, pH 7,4, y se almacenó en alícuotas a -20°C. Plaquetas lavadas se lisaron en Triton X-114, y la separación de fases se llevó a cabo en el material soluble antes de aislar las glicoproteínas de la membrana asociadas con la fase de Triton X-114 mediante cromatografía de afinidad en aglutinina de germen de trigo-Sepharose 4B, como se describió anteriormente. Como GPVI representa una fracción muy pequeña del conjunto de glicoproteínas de la membrana de las plaquetas, se usó la especificidad de la lectina de tipo C de serpiente convulxina para el aislamiento de este receptor. La cromatografía de afinidad en convulxina acoplada a Sepharose 4B dio una proteína de 65 kDa como producto principal. Sin embargo, con la GPVI coeluyó un material no caracterizado de tanto mayor como menor Mr, y no se pudo eliminar mediante lavado exhaustivo de la columna. Como etapa final de purificación, se añadió una electroforesis en gel preparativa sobre poliacrilamida al 8,5%. Las fracciones que contenían GPVI se reunieron, y dieron una única banda en el reanálisis. La GPVI purificada se ensayó en cuanto a su capacidad para bloquear la agregación plaquetaria por el colágeno. Se observó un ligero efecto inhibitor cuando se añadieron alícuotas de una disolución de GPVI a la suspensión de plaquetas. Sin embargo, mediante una preincubación de la GPVI con colágeno antes de añadir la mezcla a la suspensión de plaquetas, la agregación pudo ser inhibida de una manera dependiente de la dosis. Estas plaquetas aún se agregaban cuando se añadió colágeno nuevo. En condiciones no reductoras, la proteína aislada tiene un Mr de 62 kDa, con un desplazamiento hacia un Mr ligeramente más alto (65 kDa) en condiciones reductoras. Puesto que se encontró que el término amino de la GPVI estaba bloqueado, la proteína se digirió con las enzimas LysC y LysC/AspN, lo que produjo 4 y 6 péptidos, respectivamente, a partir de los cuales se obtuvo la secuencia. Los péptidos se separaron por HPLC de fase inversa en una columna C4, y se secuenciaron usando el método de Edman. Las secuencias de aminoácidos de estos péptidos están subrayadas en la secuencia de ADNc traducida (Fig. 1).
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

Descripción de las Sec IDs

- Sec ID Nr. 1 Secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto del gen de GPVI como se representa en la fig. 2.
- 50 Sec ID Nr. 2 Secuencia de aminoácidos de la presecuencia de la proteína GPVI como se representa mediante los aminoácidos 1 a 23 de fig. 1.
- Sec ID Nr. 3 Secuencia de aminoácidos de la proteína GPVI madura como se representa mediante los aminoácidos 24 a 316 de fig. 1.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
- 55 <120> Glicoproteína VI para el receptor de colágeno de plaquetas recombinante y su uso farmacéutico
- <130> DEAV1999/L079
- <150> EP99109094.5

ES 2 534 652 T3

<151> 07-05-1999

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1

<211> 1249

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> característica diversa

<222> (26)..(85)

<223> Secuencia líder

<220>

<221> característica diversa

15 <222> (86)..(1042)

<223> proteína GPVI madura

<400> 1

```

gagctcagga cagggctgag gaaccatgtc tccatccccg accgccctct tctgtcttgg      60
gctgtgtctg gggcgtgtgc cagcgcagag tggaccgctc cccaagccct ccctccaggc      120
tctgcccagc tccctggtgc ccctggagaa gccagtgacc ctccggtgcc agggacctcc      180
ggcgtggac ctgtaccgcc tggagaagct gagttccagc aggtaccagg atcaggcagt      240
cctttcatc ccggccatga agagaagtct ggctggacgc taccgctgct cctaccagaa      300
cgaagcctc tggctccctgc ccagcgacca gctggagctc gttgccacgg gaggttttgc      360
caaaccctcg ctctcagccc agcccggccc ggcggtgtcg tcaggagggg acgtaaccct      420
acagtgtcag actcggatg gctttgacca atttgctctg tacaaggaag gggaccctgc      480
gccctacaag aatcccgaga gatggtaccg ggctagtttc cccatcatca cggtgaccgc      540
cgcccacagc ggaacctacc gatgctacag cttctccagc agggacccat acctgtggtc      600
ggccccagc gacccccctg agcttgtggt cacaggaacc tctgtgacct ccagccggtt      660
accaacagaa ccaccttcct cggtagcaga attctcagaa gccaccgctg aactgaccgt      720
ctcattcaca aacaaagtct tcacaactga gacttctagg agtatcacca ccagtccaaa      780
ggagtcagac tctccagctg gtccctgccc ccagtactac accaagggca acctggtccg      840
gatatgcctc ggggctgtga tcctaataat cctggcgggg tttctggcag aggactggca      900
cagccggagg aagcgcctgc ggcacagggg cagggctgtg cagaggccgc ttccgcccct      960
gccgcccctc ccgcagacct ggaaatcaca cgggggtcag gatggaggcc gacaggatgt     1020
tcacagccgc gggttatggt catgaccgct gaaccccagg cacggtcgta tccaagggag     1080
ggatcatggc atgggaggcg actcaaagac tggcgtgtgt ggagcgtgga agcaggaggg     1140
cagaggctac agctgtggaa acgaggccat gctgcctcct cctggtgttc catcaggagg     1200
ccgttcggcc agtgtctgtc tgtctgtctg cctctctgtc tgagggcac     1249

```

ES 2 534 652 T3

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15
 Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly
 20

<210> 3

10 <211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp
 20 25 30
 Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala
 35 40 45
 Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg
 50 55 60
 Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu
 65 70 75 80
 Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln
 85 90 95
 Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln
 100 105 110
 Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro
 115 120 125
 Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile
 130 135 140
 Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe
 145 150 155 160

ES 2 534 652 T3

Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu
 165 170 175
 Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu
 180 185 190
 Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr
 195 200 205
 Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile
 210 215 220
 Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile
 245 250 255
 Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala Glu Asp Trp His Ser Arg Arg
 260 265 270
 Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro
 275 280 285
 Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys Ser His Gly Gly Gln Asp Gly
 290 300
 Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly Leu Cys Ser
 305 310 315

REIVINDICACIONES

1. Antisuero anti-GPVI policlonal, Fab anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, o F(ab')₂ anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, en el que GPVI tiene la secuencia de SEC ID NO:3.
- 5 2. Antisuero anti-GPVI policlonal, Fab anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, o F(ab')₂ anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI según la reivindicación 1, en el que GPVI se puede obtener a partir de plaquetas usando aglutinina de germen de trigo y convulxina y aplicando electroforesis en gel sobre poliacrilamida de alrededor de 8,5%.
- 10 3. Antisuero anti-GPVI policlonal, Fab anti-GPVI obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI, o F(ab')₂ obtenible a partir de dicho antisuero anti-GPVI según la reivindicación 1 ó 2, en el que el antisuero anti-GPVI policlonal se genera en conejos.
4. Fragmento Fab anti-GPVI de anticuerpos monoclonales de ratón humanizados frente a GPVI, en el que GPVI tiene la secuencia de SEC ID NO: 3.
- 15 5. Anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen la región N-terminal de GPVI, en el que GPVI tiene la secuencia de SEC ID NO: 3.

Figura 1

Secuencia proteica definitiva de GPVI (código de una letra)

Marco de lectura abierto 339 aminoácidos

1 23

MSPSPTALFC LGLCLGRVPA QSG

Proteína madura

PLPKPSLQAL PSSLVPLEKP VTLRCQGPPG VDLRLEKLS SSRYQDQAVL (50)

FIPAMKRSLA GRYRCSYONG SLWSLPSDQL ELVATGVFAK PLSAQPGPA (100)

VSSGGDVTLQ CQTRYGFDQF ALYKEGDPAP YKNPERWYRA SFPIITVTAA (150)

HSGTYRCYSF SSRDPYLWSA PSDPLELVVT GTSVTPSRLP TEPPSSVAEF (200)

SEATAELTVS FTNKVFTTET SRSITTSPKE SDSPAGPARQ YYTKGNLVRI (250)

CLGAVILILIL AGFLAEDWHS RRKRLRHRGR AVQRPLPPLP PLPQTRKSHG (300)

GQDGGRQDVH SRGLCS (316)

Doble subrayado = sitio de glicosilación

Subrayado = dominio transmembránico

ES 2 534 652 T3

Figura 2

Secuencia nucleotídica definitiva de GPVI que cubre el marco de lectura abierto de 1017 pb más las regiones 3' y 5' 1249 pb total

GAGCTCAGGA CAGGGCTGAG GAACCATGTC TCCATCCCCG ACCGCCCTCT (50)
TCTGTCTTGG GCTGTGTCTG GGGCGTGTGC CAGCGCAGAG TGGACCGCTC (100)
CCCAAGCCCT CCCTCCAGGC TCTGCCCAGC TCCCTGGTGC CCCTGGAGAA
GCCAGTGACC CTCCGGTGCC AGGGACCTCC GGGCGTGGAC CTGTACCGCC (200)
TGGAGAAGCT GAGTTCCAGC AGGTACCAGG ATCAGGCAGT CCTCTTCATC
CCGGCCATGA AGAGAAGTCT GGCTGGACGC TACCGCTGCT CCTACCAGAA (300)
CGGAAGCCTC TGGTCCCTGC CCAGCGACCA GCTGGAGCTC GTTGCCACGG
GAGTTTTTGC CAAACCCTCG CTCTCAGCCC AGCCCGGCC GCGGGTGTCTG (400)
TCAGGAGGGG ACGTAACCCT ACAGTGTCAG ACTCGGTATG GCTTTGACCA
ATTTGCTCTG TACAAGGAAG GGGACCCTGC GCCCTACAAG AATCCCGAGA (500)
GATGGTACCG GGCTAGTTTC CCCATCATCA CGGTGACCGC CGCCACAGC
GGAACCTACC GATGCTACAG CTTCTCCAGC AGGGACCCAT ACCTGTGGTC (600)
GGCCCCCAGC GACCCCCTGG AGCTTGTGGT CACAGGAACC TCTGTGACCC
CCAGCCGGTT ACCAACAGAA CCACCTTCCT CGGTAGCAGA ATTCTCAGAA (700)

ES 2 534 652 T3

GCCACCGCTG AACTGACCGT CTCATTCACA AACAAAGTCT TCACAACCTGA
GACTTCTAGG AGTATCACCA CCAGTCCAAA GGAGTCAGAC TCTCCAGCTG (800)
GTCCTGCCCCG CCAGTACTAC ACCAAGGGCA ACCTGGTCCG GATATGCCTC
GGGGCTGTGA TCCTAATAAT CCTGGCGGGG TTTCTGGCAG AGGACTGGCA (900)
CAGCCGGAGG AAGCGCCTGC GGCACAGGGG CAGGGCTGTG CAGAGGCCGC
TTCCGCCCTT GCCGCCCTC CCGCAGACCC GGAAATCACA CGGGGGTCAG (1000)
GATGGAGGCC GACAGGATGT TCACAGCCGC GGGTTATGTT CATGACCGCT
GAACCCAGG CACGGTCGTA TCCAAGGGAG GGATCATGGC ATGGGAGGCG (1100)
ACTCAAAGAC TGGCGTGTGT GGAGCGTGGA AGCAGGAGGG CAGAGGCTAC
AGCTGTGGAA ACGAGGCCAT GCTGCCTCCT CCTGGTGTTT CATCAGGGAG (1200)
CCGTTCGGCC AGTGTCTGTC TGTCTGTCTG CCTCTCTGTC TGAGGGCAC (1249)