

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 404**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2006 E 09153422 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2077328**

54 Título: **Composición inhibidora de la agregación plaquetaria**

30 Prioridad:

**04.11.2005 JP 2005320817**

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

**06.10.2015**

73 Titular/es:

**EDUCATIONAL FOUNDATION JICHI MEDICAL  
UNIVERSITY (50.0%)**

**3311-1, Yakushiji Shimotsuke-shi**

**Tochigi 329-0498, JP y**

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YOSHIDA, SHIGETO y**

**SUDO, TOSHIKI**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 547 404 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

Composición inhibidora de la agregación plaquetaria.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un polipéptido que presenta una actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de su adhesión, o a una composición farmacéutica por ejemplo, una composición inhibitoria de la agregación plaquetaria que incluye un producto de expresión (polipéptido recombinante), que se expresa mediante un polinucleótido que codifica el polipéptido como un componente activo.

La presente invención se refiere además a un polipéptido que presenta una capacidad de unión al colágeno, o a una composición farmacéutica que comprende al polipéptido como componente activo.

15 La presente invención se refiere también a un procedimiento para el cribado de un compuesto (por ejemplo, un agonista), que facilita la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria como un compuesto activo en la composición farmacéutica. Además, la presente invención se refiere a un polipéptido que posee la actividad inhibitoria de agregación plaquetaria y un polinucleótido que codifica al mismo.

20 **Técnica anterior**

La agregación plaquetaria se debe a la alteración de las células endoteliales vasculares, y a otros factores diversos. Cuando un vaso coronario, un vaso cerebral o un vaso periférico, se ocluyen por este trombo plaquetario, se producen, respectivamente, infarto miocárdico, infarto cerebral u obstrucción arterial crónica. Los ejemplos de enfermedades trombóticas después de dicha activación (estimulación de la agregación) de las plaquetas, incluyen esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, enfermedades cardíacas isquémicas que incluyan infarto miocárdico y angina, obstrucción crónica arterial y trombosis venosa.

Los medicamentos que inhiben la agregación plaquetaria se utilizan como preventivos para enfermedades isquémicas que presentan como complicaciones las varias patologías antes mencionadas, y como medicamentos preventivos para estados patológicos subsiguientes a hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar y hemorragia subaracnoidea. Además, los medicamentos mencionados se utilizan para prevenir la formación de trombos después de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) y del emplazamiento de las endoprótesis vasculares, utilizándose asimismo como agentes preventivos de la restenosis después de que dichas prótesis se sitúen, envolviendo dichos medicamentos (que poseen la acción de inhibir la agregación plaquetaria) a, o integrándolos, en las endoprótesis vasculares mismas.

Mientras tanto, un mosquito penetra la piel con su afilada aguja oral, que alcanza los vasos sanguíneos periféricos cuando succiona la sangre, repitiendo frecuentemente un pinchazo (en un comportamiento "interior y exterior"), que se refiere a un sondeo para encontrar el vaso sanguíneo periférico. Se cree que el mosquito segrega simultáneamente saliva que contiene una sustancia para facilitar la vasodilatación que facilite la detección del vaso sanguíneo. Debido al sondeo anterior, el vaso sanguíneo periférico se daña a menudo hasta congestionarse. Generalmente cuando el vaso sanguíneo se daña, se expone el colágeno tisular bajo el endotelio vascular, y a partir de las células rotas, se libera el adenosin difosfato (ADP), activándose los factores de coagulación para formar trombina. La trombina activa intensamente las plaquetas para inducir la adhesión plaquetaria, la agregación plaquetaria y la liberación de gránulos, formando eventualmente un trombo firme mediante la coagulación sanguínea con la formación de fibrina (mecanismo de hemostasia). Se ha conocido que la saliva del mosquito contiene la sustancia que inhibe dicho mecanismo hemostático (ver la literatura no de patente, 1).

50 Una proteína de la glándula salivar en el mosquito que se estudió con mayor detalle, es la apirasa. Este enzima es una sustancia que inhibe la agregación plaquetaria que se identificó en la saliva de *Aedes aegypti* al principio. La apirasa inhibe la agregación plaquetaria dando lugar a la descomposición del ADP liberado a partir de las células endoteliales vasculares dañadas, los eritrocitos y las plaquetas adheridas a AMP (adenosin monofosfato) y para exhibir una acción antihemostática. Para dilucidar un comportamiento vampírico de varios insectos vampíricos, más allá del mosquito, parece esencial analizar la función de sus sustancias salivares.

Se cree que diversas sustancias salivares están implicadas en la inhibición de la agregación plaquetaria, y, por ejemplo, se ha informado de una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria, para la proteína derivada de *Triatoma infestans* (ver documentos 1 y 2 de patente).

60 Entre las proteínas derivadas de la glándula salival en *Anopheles stephensi*, se ha identificado la proteína que posee una actividad inhibitoria de la coagulación sanguínea, pero no se ha observado una proteína que muestre una actividad inhibidora de la agregación plaquetaria (ver Documento 3 de patente).

65 Además, se ha informado de 33 nuevas proteínas a partir de la clonación de la biblioteca cADN de la glándula salival de *Anopheles stephensi* y, tal como se describe en el informe, no se encontraron proteínas que mostraran la

actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria, permaneciendo sus funciones, en muchas de ellas, desconocidas (ver la literatura 2 no de patente).

Se informó previamente de una proteína (AAPP) que presentaba una secuencia GE rica en (Gly Glu) clonada a partir de las glándulas salivares en *Anopheles stephensi* (ver literatura no de patente 3). La proteína muestra un marco de lectura abierto (ORF) de 810 bases, y la proteína que se deduce de 28,5 kDa que está compuesta por 269 residuos aminoácidos. Se encontró entonces que la proteína era similar a un antígeno de 30 kDa (Número de Registro en GenBank, AY226454), antígeno que se da a conocer en la literatura 2 no de patente, pero no existe descripción de acciones y funciones (actividad) de la proteína en las literaturas 2 y 3 no de patentes.

La literatura no de patente 4 se refiere al mRNA ansg-1 de *Anopheles stephensi* para la proteína de la glándula salival rica en GE, cds completa. La literatura 6 no de patente se refiere a la expresión transgénica específica de la glándula salival en el mosquito *Anopheles stephensi*. La literatura 5 no de patente se refiere al procedimiento para la preparación de un inhibidor modificado palidipínico de la agregación plaquetaria inducida por el colágeno.

[Documento 1 de Patente] Publicación JP 2004-121091-A

[Documento 2 de Patente] Publicación JP 2004-121086-A

[Documento 3 de Patente] Publicación JP 2003-116573-A

[Literatura 1 de no de patente] Riberio, J.M., J. Exp. Biol., 108, 1-7 (1984)

[Literatura 2 de no de patente] Valenzuela, J.G., et al., Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito" Insect Biochemistry.

[Literatura 3 no de patente] Hiroyuki Watanabe et al., Medical Entomology and Zoology 55 Suppl., pp41, 19 (2004).

[Literatura 4 no de patente]: DATABASE EMBL [Online] 3 Julio 2003 (2003-07-03), *Anopheles stephensi* ansg-1 mRNA for GE rich salivary gland protein, complete cds." recuperado del EBI, nº de registro EBL: AB113667, nº registro AB113667 de base de datos.

[Literatura 5 no de patente] WO 96/08563 A (SCHERING AG [DE]; NOESKE JUNGBLUT CHRISTIANE [DE]; BECKER ANDREAS [DE] 21 Marzo 1996(1996-03-21).

[Literatura 6 no de patente] DATABASE GENPEPT [Online] YOSHIDA S. ET AL., nº registro en base de datos (Q7YT37)

### Exposición de la invención

La presente invención proporciona una nueva composición farmacéutica, particularmente un inhibidor de la agregación plaquetaria y/o un inhibidor de la adhesión plaquetaria.

La presente invención proporciona además una nueva composición farmacéutica que incluye una proteína, que posee una capacidad de unión al colágeno, como un componente activo.

La presente invención proporciona también un procedimiento para cribar una sustancia tal como un agonista, el procedimiento de cribado que determina una actividad inhibitoria de agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de adhesión plaquetaria de la sustancia.

Como resultado de otro estudio exhaustivo separado del llevado a cabo sobre la proteína (AAPP) del que se ha informado previamente, se descubrió una nueva proteína que mostraba una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria en las glándulas salivares del *Anopheles stephensi*, aislada con éxito e identificando un ADN codificante de a proteína, encontrando nuevamente que la proteína mostraba la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

La presente invención proporciona unas invenciones que caracterizan los ítems 1 a 16 siguientes:

1. Composición farmacéutica para su utilización como un medicamento, que incluye por lo menos un polipéptido de los siguientes (a) a (b) como un componente activo:

(a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3; y

(b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que posee una homología del 70% o más con la secuencia de aminoácidos del (a) anterior y que posee una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o

una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

2. Composición farmacéutica para su utilización como un medicamento que incluye un polipéptido, el cual expresa por lo menos, un polinucleótido de los siguientes (c) a (e) como un componente activo:

(c) un polinucleótido que incluye la secuencia de ADN de SEC ID nº: 4, o su complemento;

(d) un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido del (c) anterior, bajo condiciones rigurosas, siendo capaz de expresar un polipéptido que posee una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria; y

(e) un polinucleótido que incluye la secuencia de ADN que tiene una homología del 80% o más con el polinucleótido del (c) anterior y que puede expresar un polipéptido que posee una actividad inhibitoria agregatoria plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de adhesión plaquetaria es la actividad inhibitoria a la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y/o la actividad inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria al colágeno.

4. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha composición farmacéutica posee la capacidad de unión con el colágeno.

5. Inhibidor de la agregación plaquetaria y/o inhibidor de la adhesión plaquetaria, que incluye el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o el polipéptido, que se expresa mediante el polinucleótido que se describe en la reivindicación 2, para utilización como un medicamento.

6. Composición farmacéutica para utilización en el tratamiento o prevención de un estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo, que incluye por lo menos un polipéptido de los siguientes (a) a (b) como componente activo:

(a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3; y

(b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que posee una homología del 70% o más para la secuencia de aminoácidos del (a) anterior y que posee una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

7. Composición farmacéutica para utilización en el tratamiento o prevención de un estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo que incluye un polipéptido, el cual es expresado por lo menos por un polinucleótido de los siguientes (c) a (e) como componente activo:

(c) un polipéptido que incluye la secuencia del ADN de SEC ID nº: 4, o de su complemento;

(d) Un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido del (c) anterior, bajo condiciones rigurosas, y es capaz de expresar un polipéptido que posee una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria; y

(e) un polinucleótido que incluye la secuencia de ADN que posee una homología de 80% o superior para el polinucleótido del (c) anterior, y puede expresar un polipéptido que posee una actividad inhibitoria de la agregación y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

8. Procedimiento para cribar un agonista para una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria donde un nivel de actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria del polipéptido descrito en la reivindicación 1, se mide en presencia o ausencia de una sustancia objeto, y un valor de medición en presencia de la sustancia objeto, se compara con el valor de la medición en ausencia de la sustancia objeto, para seleccionar la sustancia objeto que aumente la acción inhibitoria como el agonista.

9. Procedimiento para cribar una sustancia que facilita una actividad inhibitoria de agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de adhesión plaquetaria, en el que un nivel de la actividad inhibitoria del polipéptido que se describe en la reivindicación 1 o el polinucleótido descrito en la reivindicación 2, se mide en presencia o ausencia de una sustancia objeto y un valor de medición en presencia de la sustancia objeto se compara con un valor de medición en ausencia de la sustancia objeto, para seleccionar la sustancia objeto que aumenta la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria como agonista.

10. Procedimiento para cribar una sustancia candidata que facilita una actividad inhibitoria de la agregación

plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria del polipéptido descrito en la reivindicación 1 o el polipéptido descrito en la reivindicación 2 que incluye las siguientes etapas (1) a (4):

5 (1) una etapa para preparar un medio de cultivo que incluye una célula transformada con un vector de expresión, que expresa el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o una célula que incluye el polipéptido, que se expresa por el polinucleótido descrito en la reivindicación 2 y plasma rico en plaquetas;

10 (2) una etapa de adición de un agente de agregación de plaquetas en el medio de cultivo del (1) anterior, para inducir la agregación plaquetaria en presencia o ausencia de una sustancia objeto;

(3) una etapa de medición del nivel de la agregación plaquetaria en presencia o ausencia de la sustancia objeto en el (2) anterior; y

15 (4) una etapa de selección de la sustancia objeto como sustancia candidata cuando un valor de medición en presencia de la sustancia objeto es mayor que un valor de medición en ausencia de la sustancia objeto.

20 11. Kit para el cribado de un agonista para el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o el polipéptido que se expresa mediante el polinucleótido descrito en la reivindicación 2, caracterizado por que contiene como componente plasmático en plaquetas, uno de los polipéptidos descritos en la reivindicación 1 y el polipéptido descrito en la reivindicación 2, así como un agente agregante plaquetario.

12. Polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC ID nº: 3 o 5, para su utilización en terapia.

25 13. Polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC ID nº: 3 o 5 para utilización en el tratamiento o prevención de una condición patológica causada por la formación de un trombo o émbolo.

30 14. Utilización de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC ID nº: 3 o 5, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo.

15. Polipéptido formado por la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3.

35 16. Polinucleótido formado por la secuencia de ADN de SEC ID nº: 4 o su complemento.

Por lo menos, a un polipéptido (proteína) de los (a) anteriores a (d), se hace referencia como "SY-001" en adelante. El polipéptido, por lo menos a un polinucleótido de los anteriores (e) a (j), se hace referencia como "polipéptido" de la presente invención.

#### 40 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 representa la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001 producida en el ejemplo 1, 3(1), inducida por estimulación con colágeno;

45 La figura 2 representa la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001 producida en el ejemplo 1, 3(2) inducida por la estimulación con colágeno;

50 La figura 3 representa la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria de SY-001 producida en los ejemplos 1 y 3, que inhibe la adhesión plaquetaria al colágeno en el Ejemplo 5; y

La figura 4 representa que el SY-001 producido en los ejemplos 1 y 3 posee la capacidad de unión al colágeno en el ejemplo 6.

#### 55 **Mejores modos de poner en práctica la invención**

La representación en la presente memoria mediante abreviaturas de aminoácidos, péptidos, secuencias básicas y ácidos nucleicos accede a IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9(1984), definido por IUPAC-IUB, "Guideline for preparing specifications comprising base sequences and amino acid sequences" (Oficina de Patentes) y a las notas que se utilizan habitualmente en la técnica.

60 Un polinucleótido (molécula de ADN) comprende no sólo el ADN de cadena doble, sino también el ADN de cadena única que incluye cadenas "con sentido" y cadenas "antisentido" que los componen, no limitándose a su longitud. Por tanto, el polinucleótido que codifica SY-001 incluye el ADN bicatenario que incluye ADN genómico y el ADN de cadena única (con sentido) que incluye cADN y el ADN de cadena única (cadena sin sentido) que presenta la secuencia complementaria a la cadena con sentido y fragmentos de ADN sintético, si no se menciona otra cosa.

65

El polinucleótido que se menciona en la presente memoria (molécula de ADN) no está definido por una región funcional, y puede incluir por lo menos una de una región de supresión de la expresión, una de una región codificante, una secuencia líder, un exon y un intrón.

- 5 El polinucleótido incluye también ADN y ARN. El polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos cierta y el polinucleótido que incluye la secuencia de ADN cierta, incluye fragmentos, homólogos, derivados y sus mutantes.

10 Los mutantes del polinucleótido (ADN mutante) incluyen mutantes alélicos que se encuentran de forma natural, mutantes que no se presentan naturalmente y mutantes con delección, sustitución, adición e inserción. Pero, estos mutantes codifican el polipéptido, teniendo sustancialmente idéntica función que la del polipéptido codificada por el polinucleótido antes de la mutación.

15 No es necesario que la mutación del polipéptido (modificación de la secuencia de aminoácidos) tenga que ocurrir mediante la que tiene lugar de forma natural, por ejemplo, mutación o modificación postraducción pudiendo ser la realizada artificialmente utilizando la proteína que se encuentra naturalmente (por ejemplo SY-001). Los mutantes anteriores del polipéptido incluyen variantes alélicas, homólogos y mutantes naturales que posean por lo menos el 80%, preferentemente el 95%, y más preferentemente una homología del 99% con respecto al polipéptido antes de la mutación.

20 La homología del polipéptido o del polinucleótido puede analizarse mediante medición utilizando el programa FASTA (Clustal, V., Methods Mol. Biol., 25, 307-318 (1994)). Como procedimiento más preferido y sencillo para un análisis de homología es posible ejemplificar el procedimiento en el que la secuencia se almacena en un medio (por ejemplo, disco flexible, CD-ROM, gobierno del disco duro, gobierno del disco externo, DVD, etc.), capaz de ser leído mediante ordenador y entonces, buscando bases de datos de secuencia, conocidas, de acuerdo con el procedimiento bien conocido de búsqueda que utiliza la secuencia almacenada. Los ejemplos específicos de bases de datos secuenciales conocidos incluyen los siguientes:

- 30 -DNA Database of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>);  
 -Genebank (<http://www.cnbi.nlm.nih.gov/web/Genebank/Index.html>); y  
 -the European Molecular Biology Laboratory Nucleic Acid Sequence Database (EMBL) ([http://www.ebi.ac.uk/ebi\\_docs/embl\\_db.html](http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db.html)).

35 Están disponibles para los expertos en la materia unos lotes de algoritmos de búsqueda para el análisis homólogo. Un ejemplo suyo incluye un programa al que se hace referencia como programa BLAST. Existen 5 procedimientos BLAST en este programa. Tres (BLASTN, BLASTX y TBLASTX) entre ellos se diseñaron para chequear la secuencia nucleótida. Los dos restantes se diseñaron para comprobar la secuencia proteica (Coulson, Trends in Biotechnology, 12:76-80 (1994); Birren, et al., Genome Analysis, 1:543-559 (1997)).

40 Además, unos programas adicionales, por ejemplo, un programa secuencial de alineamiento y un programa para identificar las secuencias más distantemente separadas, están disponibles en la técnica para analizar la secuencia identificada.

45 El ADN mutante es silencioso (no cambia en un residuo aminoácido codificado por una secuencia ácido nucleica mutada) o conservador para el aminoácido codificado por el mismo. Los ejemplos de sustitución conservadora de aminoácidos se muestran a continuación.

	Residuo aminoácido original	Residuo aminoácido sustituido conservador
50	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln o His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
55	Gln	Asn
	Glu	Asp
	Gly	Pro
	His	Asn o Gln
	Ile	Leu o Val
60	Leu	Ile o Val
	Lys	Arg, Asn o Glu
	Met	Leu o Ile
	Phe	Met, Leu o Tyr
	Ser	Thr
65	Thr	Ser
	Trp	Tyr

Tyr  
ValTrp o Phe  
Ile o Leu

5 Generalmente, uno o más codones que codifican un residuo Cys afectan a un enlace disulfuro del polipéptido particular.

Se cree generalmente que la sustitución del residuo aminoácido afecta a las características de la proteína, incluyendo las siguientes:

10 a) la sustitución de un residuo hidrófobo con un residuo hidrófilo, la sustitución de Leu, Ile, Phe Val o Ala con Ser o Thr;

b) la sustitución de un residuo aminoácido distinto a Cys y Pro con Cys o Pro;

15 c) la sustitución del residuo que presente una cadena lateral eléctricamente positiva, por ejemplo, Lys, Arg o His con un residuo eléctricamente negativo, por ejemplo Glu o Asp; y

d) la sustitución del residuo aminoácido que presenta una cadena lateral extremadamente larga, por ejemplo, Phe con el residuo aminoácido que no presenta una cadena lateral, por ejemplo, Gly.

20 (1) SY-001

25 SY-001 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3 o la secuencia de aminoácidos que posee una homología del 70% o más con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3, y posee actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria, que inhibe la adhesión plaquetaria al colágeno y/o la capacidad de unión al colágeno.

30 El SY-001 puede ser el polipéptido que se expresa en un sistema de expresión proteico utilizando *Escherichia coli* o un sistema de exposición proteico que utiliza el baculovirus (AcNPV) que se muestra en los Ejemplos que se describen a continuación mediante tecnología de recombinación génica o el polipéptido obtenido mediante síntesis química.

35 Como un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de SY-001, es posible ejemplificar uno de SEC ID n°: 3. La secuencia de aminoácidos de SY-001 no se limita a SEC ID n°: 3, y puede ser (o las homólogas) la que presenta una cierta homología. Las homólogas pueden incluir el polipéptido que incluye polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos que presenta una homología del 70% o más, para la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3 y que posee la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria, que inhibe la adhesión plaquetaria al colágeno y/o la capacidad de unión al colágeno.

40 La actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria, que SY-001 presenta, incluye acciones para inhibir o bloquear la situación en la que la sustancia que induce la agregación plaquetaria aumenta en los vasos sanguíneos del hombre (particularmente en las arterias coronarias, aorta y arterias cerebrales), o una capacidad de agregación de las plaquetas se facilita en los vasos sanguíneos, o la condición en la que se ha producido el daño en los vasos sanguíneos y las plaquetas produce la agregación excesiva del sitio dañado.

45 Esta actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria puede detectarse inhibiendo (suprimiendo) la agregación de las plaquetas inducida por el agente agregador plaquetario en el plasma rico en plaquetas (PRP) añadiendo SY-001 en el plasma, en el experimento *in vitro*.

50 Más particularmente, la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria, de SY-001, puede determinarse mediante el procedimiento siguiente. Es decir, en primer lugar, se prepara el PRP a partir de la sangre humana entera, mediante centrifugación. A continuación, este PRP preparado se preincuba con una solución, por ejemplo, una solución de PBS que contiene SY-001, añadiéndose posteriormente el agente de agregación plaquetaria a esta solución para agregar a las plaquetas. Los ejemplos del agente de agregación incluyen ADP (adenosina di-fosfato), colágeno, CRP (péptido relacionado con el colágeno, convulxina, TRAP (péptido activador del receptor de trombina) epinefrina, ácido araquidónico, U-46619 (análogo tromboxano A2, análogo TXA2) y A23187 (ionóforo cálcico). Se midió una tasa de agregación plaquetaria de la solución resultante, utilizando un agregómetro plaquetario transmisor lumínico turbidimétrico (MCM HEMA TRACER 313M: proporcionado por MC Medical), y se calculó una tasa inhibitoria de agregación plaquetaria de SY-001 a partir de un valor obtenido de medición basado en el valor en el control que no contiene SY-001. De esta forma, la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001, puede detectarse.

60 La actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria de SY-001 puede también determinarse mediante el procedimiento siguiente.

Una solución de PBS que contenía SY-001 a concentraciones dadas, se añadió a una placa de 96 pocillos revestidos con una solución de colágeno, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la suspensión plaquetaria se añadió a los pocillos, incubándose durante 45 minutos a la misma temperatura. Después de la incubación, la solución de incubación se eliminó con una pipeta de los pocillos y éstos se lavaron con PBS.

La solución de PBS que contenía SDS al 1% se añadió al pocillo, secándose éste con aire, después de mezclado y agitación. Entonces, se añadió al pocillo agua destilada, midiéndose la cantidad de proteína en cada pocillo utilizando un equipo de ensayo de proteína Dc (BIO-RAD Laboratories). La tasa de actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria de SY-001 se calcula a partir de un valor de medición obtenido basado en el valor en el control que no contiene SY-001, y calculando la actividad inhibitoria de adhesión plaquetaria de SY-001, a partir de su curva de adhesión plaquetaria. Así, la actividad inhibida de la adhesión plaquetaria de SY-001, que inhibe la adhesión plaquetaria al colágeno, puede detectarse.

La capacidad de unión al colágeno de SY-001, puede determinarse también mediante el procedimiento siguiente.

Una solución de 300 µl, de bloqueo, se añade a cada uno de los 96 pocillos de una placa, con o sin revestimiento de colágeno, incubándose durante 1 hora. Después de eliminar la solución de incubación de cada pocillo, 100 µl de la solución conteniendo SY-001, a concentraciones dadas, se añade a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de incubación de cada pocillo, se añadieron a cada pocillo 200 µl de sacarosa al 2%, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de incubación de cada pocillo, y de que éstos se secaran, 100 µl de la solución Ni-HRP reconstituida (KPP: Kirkegaard & Perry Laborator, Ltd.), se añadió a cada pocillo, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón de baño, 100 µl del Sustrato Peroxidásico ABTS (KPL, Ltd.), se añadió a cada pocillo, agitándose suavemente la placa de 96 pocillos.

Después de acabar la reacción, se añadieron 100 µl de SDS al 1% a cada pocillo, midiéndose entonces éste utilizando un Lector Micro Placa con un cambio en la absorbancia a 405-410 nm.

La capacidad de unión SY-001 al colágeno a concentraciones dadas, se calcula a partir de un valor OD obtenido que se base en el valor en el vector de control que no contiene SY-001 y calculando la capacidad de unión del colágeno de SY-001 a partir de su curva de unión del colágeno. Así puede detectarse la capacidad de unión al colágeno de SY-001.

Una actividad antiplaquetaria que SY-001 tiene, puede también determinarse mediante el procedimiento siguiente. Es decir, se prepara PRP a partir de la sangre total obtenida recuperando una muestra sanguínea utilizando una jeringuilla con un anticoagulante de un donante sano mediante centrifugación. Entonces el PRP preparado se diluye con un tampón apropiado, por ejemplo, Tyrode-Hepes (134 mM NaCl, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM Hepes, 5 mM glucosa, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,3), y SY-001 a concentraciones dadas, se añade a esta dilución seriada, preincubándose.

El anticuerpo anti-P selectina marcado mediante fluorescencia, un anticuerpo (proporcionado por Becton Dickinson), que reconoce PAC-1 (complejo GPIIb/GPIIIa), fibrinógeno, y anexina V, se añaden a esta solución, y a continuación, para activar las plaquetas, se añade el agente agregante de plaquetas, por ejemplo, ADP, colágeno o TRAP. Así, la intensidad fluorescente de las plaquetas activadas se mide mediante citometría de flujo para evaluar la actividad (actividad inhibitoria sobre la activación) de SY-001 sobre la activación plaquetaria. Esta actividad inhibitoria sobre la activación plaquetaria es una actividad inhibitoria de la activación plaquetaria.

En el procedimiento anterior, si los anticuerpos marcados con la fluorescencia que reconocen las plaquetas y los leucocitos se utilizan, también es posible evaluar la del compuesto sobre una interacción de las plaquetas y de los leucocitos (adhesión plaqueto-leucocitaria).

Para detalles del procedimiento para medir la actividad inhibitoria de SY-001 sobre la agregación plaquetaria, utilizando el agregómetro plaquetario lumínico-transmisor turbidimétrico, la presente invención se refiere a, por ejemplo, Born, G.V.R., "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal", Nature, 1962, 194, 927-9 and Sudo, T., et al., "Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity", Biochem. Pharmacol., 2000, 59, 347-56. Para la medición de la activación plaquetaria, esta invención se refiere también a, por ejemplo, Ito, H., ET AL., "Cilostazol inhibits platelet-leukocyte interaction by suppression of platelet activation", Platelets, 2004, 15, 293-301.

Por tanto, SY-001, que posee la actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria, tiene una posibilidad como agente terapéutico para la aparición o prevención de enfermedades relacionadas con la sangre y sus complicaciones, actuando sobre la sangre y los vasos sanguíneos en los mamíferos, para inhibir o prevenir la formación de trombos o émbolos.

De acuerdo con esto, SY-001, que posee la actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria, se cree que tiene la posibilidad de ser útil como el agente terapéutico o el preventivo para los estados patológicos subsiguientes a las enfermedades y sus complicaciones, por ejemplo, infarto miocárdico, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, fallo cardíaco, nefritis, fallo renal y hemorragia subaracnoidea, causadas por la formación de trombos o émbolos.

El SY-001, que presenta la actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria, se cree que tiene también la posibilidad de ser útil para prevenir la formación de trombos sobre PTCA y el emplazamiento de las endoprótesis vasculares, y como agente preventivo de la restenosis después de situar la endoprótesis vascular envolviendo el medicamento que contiene SY-001, y aplicándolo sobre o integrándolo en la endoprótesis vascular misma.

No están particularmente limitados el grado y la posición de la modificación de los residuos aminoácidos en SY-001, representados como los anteriores (b) y (d), siempre que el polipéptido (o su equivalente) que incluye la secuencia de aminoácidos modificada posea sustancialmente idéntica actividad que la del polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3. Resulta preferido que la anterior modificación se lleve a cabo típicamente con aproximadamente, como a varios residuos aminoácidos.

En la presente invención, las “deleciones, inserciones, sustituciones o adiciones de múltiples aminoácidos”, se refieren a que 2 o más y 20 o menos aminoácidos se han eliminado, insertado, sustituido o añadido. Los aminoácidos múltiples son preferentemente 2 o más y 10 o menos, más preferentemente 2 o más y 7 o menos, y, todavía más preferentemente, 2 o más y 5 o menos. Esta secuencia de aminoácidos modificada posee una homología del 70% o más, preferentemente de aproximadamente 80% o más, más preferentemente de aproximadamente 95% o más, y más preferentemente todavía de aproximadamente 98% o más, con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3.

Los ejemplos específicos del polipéptido (SY-001) que es el componente activo de la composición farmacéutica de esta invención, son tal como se muestran en los Ejemplos que se describen a continuación.

El SY-001 posee la actividad inhibitoria de una inherente agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

El SY-001 presenta también la capacidad inherente de unión al colágeno.

Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención que contiene SY-001 como componente activo, es útil como agente terapéutico o preventivo de estados patológicos subsiguientes a las enfermedades y sus complicaciones, por ejemplo, síndrome coronario agudo, infarto miocárdico, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, insuficiencia cardíaca, nefritis, fallo renal y hemorragia subaracnoidea, causados por la formación de trombos o émbolos. La composición farmacéutica de la presente invención también es útil para la prevención de la formación de trombos después del emplazamiento PTCA y de la endoprótesis vascular y como agente preventivo de la reestenosis después de situar la endoprótesis aplicándola sobre ella misma.

(2) Polinucleótido (molécula de ADN) que codifica SY-001.

Una muestra específica del polinucleótido que codifica SY-001 (al que a veces se hace referencia como “una molécula de ADN de SY-001), puede incluir el polinucleótido (molécula de ADN) que comprende la secuencia ADN de SEC ID n°: 4 o su complemento.

Otro ejemplo de la molécula de ADN de SY-001 incluye el polinucleótido que hibrida con el polinucleótido que incluye el complemento para la secuencia de ADN de SEC ID n°: 4 bajo la condición rigurosa y que puede expresar el polipéptido que posee la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

La “condición rigurosa” en la presente memoria puede incluir aquella en que tiene lugar la hibridización en 2 x SSC que contiene SDS al 0,1% a 50°C y no está separado lavando en 1 x SSC al 0,1% a 60°C.

Además, otro ejemplo de la molécula de ADN (polinucleótido) de SY-001 incluye el polinucleótido que comprende la secuencia de ADN que posee una homología del 80% o más, preferentemente el 95% o más, y más preferentemente de aproximadamente 98% o más con respecto a la más estrechamente relacionada entre los polinucleótidos que comprenden la secuencia de ADN de SEC ID n°: 4 o su complemento y que es capaz de expresar el polipéptido que posee la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

Para las moléculas de ADN (a las que a veces se hace referencia como las moléculas ADN modificadas), que pueden expresar los polipéptidos que se muestran como estos otros ejemplos que poseen la acción deseada, constituye un requisito esencial que el polipéptido de la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ADN, puede expresar la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria (particularmente la actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y/o la actividad inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria al colágeno). En otras palabras, el requisito es que un transformante transformado con un vector recombinante de expresión, en el que el polinucleótido (molécula de ADN modificado) se han insertado, puede expresar la proteína que posee la actividad inhibitoria de la agregación palquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria como el polipéptido suyo.

La molécula anterior de ADN modificado incluye moléculas de ADN que comprenden las secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3, particularmente las secuencias de aminoácidos (secuencias aminoácidas modificadas) con una homología secuencial del 70% o más, y las secuencias del ADN que codifican su complemento. El ADN modificado puede ser aquél que pueda detectar la molécula de ADN de la presente invención antes de la modificación, utilizándolo.

Una molécula homóloga de ADN para el polinucleótido (ADN de SY-001, o sus fragmentos), incluido en la molécula de ADN de SY-001 y comprendiendo la secuencia de ADN de SEC ID n°: 4, significa una serie de moléculas relacionadas de ADN, con una homología secuencial para la secuencia de ADN de SEC ID n°: 4 y reconocidas como una familia de moléculas de ADN por sus características estructurales y comunes en sus estructuras de expresión y similitud en sus funciones biológicas.

Dicha molécula homóloga de ADN puede consistir en la obtenida artificialmente basándose en la molécula de ADN que se encuentra de forma natural (por ejemplo, un fragmento de ADN de SY-001). Los ejemplos de este procedimiento artificial incluyen técnicas de ingeniería genética tales como la mutagénesis puntual [Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); *ibid.* 199, 466 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984)]; "Zoku Seikagaku Jikken Kouza 1", "Idenshi Kenkyuho II" editado por la Japanese Biochemical Society, p105 (1986)], chemical synthesis procedures such as phosphotriester method and phosphoamidite method [J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); *ibid.* 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); *ibid.* 24, 245 (1983)] y sus combinaciones. Más específicamente, la molécula de ADN puede sintetizarse también mediante el procedimiento de la fosforamidita o el del fosfotriéster, pudiendo sintetizarse también utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automático disponible comercialmente. Puede obtenerse un fragmento bicatenario sintetizando una cadena complementaria e hibridando la cadena complementaria con una cadena monocatenaria sinterizada químicamente bajo condiciones apropiadas, o añadiendo la cadena complementaria a la cadena monocatenaria sintetizada químicamente, utilizando ADN polimerasa con cebadores apropiados.

La secuencia de ADN SEC ID n°: 4, que constituye una forma de realización específica de la molécula de ADN de SY-001, es un ejemplo de la combinación de codones que codifican residuos aminoácidos del polipéptido, que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3. La molécula de ADN de SY-001 no está limitada a la molécula de ADN que presenta dicha secuencia particular de ADN, y puede presentar la combinación de codones opcionales y la secuencia seleccionada de ADN para cada residuo aminoácido. El codon puede seleccionarse según el procedimiento estándar. En este momento, puede considerarse una frecuencia de utilización de un codon en un huésped utilizado [Nucleic Acids Res., 9, 43 (1981)].

### (3) Producción de la molécula de SY-001

La molécula de ADN de SY-001 puede obtenerse fácilmente mediante síntesis basada en la información de la secuencia ácido nucleica del polinucleótido que codifica SY-001 que se da a conocer en la presente memoria o que sintetiza directamente la molécula de ADN que corresponde a la secuencia ácidonucleica que codifica la secuencia de aminoácidos que se basa en la información secuencial aminoácida de SY-001 (síntesis química del ADN). Las técnicas generales de ingeniería genética pueden aplicarse a esta producción [por ejemplo, Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); "Zoku Seikagaku Jikken Kouza 1", "Idenshi Kensyuhō II" Edited by the Japanese Biochemical Society (1986)].

Como un procedimiento químico de síntesis del ADN en el que la molécula de ADN de SY-001 se sintetiza directamente, es posible proporcionar a título de ejemplo un procedimiento de síntesis en fase sólida mediante el procedimiento de la fosfoamidita. Puede utilizarse un sintetizador automático para este procedimiento de síntesis.

La producción de la molécula de ADN de SY-001 mediante ingeniería genética puede llevarse a cabo, más específicamente, preparando una biblioteca cADN a partir de una fuente apropiada, en la que la molécula de ADN de SY-001, se haya expresado de acuerdo con el procedimiento estándar y seleccionando un clon deseado de la biblioteca, utilizando una sonda apropiada o anticuerpo específico para la molécula ADN de SY-001, [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)].

Anteriormente, como origen del cADN, es posible ejemplificar varias células y tejidos en los que la molécula de ADN de SY-001 se expresa, y en las células cultivadas que de ellos derivan. En particular, es deseable hacer que la

glándula salival de *Anopheles stephensi* sea la fuente de un triatoma. La totalidad de la extracción y aislamiento del ARN total de la fuente, la separación y purificación del mARN, y la adquisición y clonación del cADN puede llevarse a cabo según los procedimientos estándares.

5 La molécula de ADN de SY-001 puede producirse utilizando la biblioteca de cADN de la glándula salival de *Anopheles stephensi* obtenida mediante extracción, separación y purificación del mARN de la glándula salival. Además de esto, la molécula de ADN de SY-001 puede también producirse utilizando una biblioteca fágica preparada extrayendo el mARN anterior de la glándula salival, añadiendo poly A al ARN, recuperando entonces el  
10 ARN con poly A, produciendo cADN utilizando transcriptasa inversa, y, a continuación, añadiendo sitios enzimáticos de destrucción a ambos extremos del cADN, que se incorpora a un pago.

El procedimiento para el cribado de la molécula de ADN de SY-001 a partir de la biblioteca de cADN no está particularmente limitado, y puede llevarse a cabo con los procedimientos estándares. Como el procedimiento específico, es posible ejemplificar el procedimiento en el que se seleccione un correspondiente clon cADN mediante  
15 cribado inmunológico, utilizando un anticuerpo, (por ejemplo, antianticuerpo de la saliva de *Anopheles stephensi*), específico para la proteína producida por el cADN de hibridación en placa que utiliza la sonda que se une selectivamente a la secuencia del ADN objetivo, un procedimiento de hibridación colonial y sus combinaciones.

La sonda utilizada en cada procedimiento de hibridación anterior es generalmente el fragmento de ADN sintetizado químicamente basado en la información para la secuencia de ADN de la molécula de ADN de SY-001. La molécula  
20 de ADN de SY-001 y su fragmento ya obtenido, puede utilizarse ventajosamente como la sonda anterior. Además, un cebador con sentido y uno antisentido obtenidos basándose en la información secuencial del ADN para la molécula de ADN de SY-001 puede también utilizarse como las sondas para el cribado anterior.

25 El ADN (nucleótidos) utilizado como sonda en el ADN parcial (nucleótidos), que corresponde a la secuencia de ADN de SY-001 incluye por lo menos 15 ADN consecutivos, preferentemente, por lo menos, 20 ADN consecutivos y más preferentemente, por lo menos, 30 ADN consecutivos. El clon positivo en sí mismo para la producción anterior de la molécula de ADN de la presente invención, puede utilizarse como la sonda.

30 Cuando la molécula de ADN de SY-001 se obtiene, puede utilizarse apropiadamente un procedimiento de amplificación de ADN/ARN mediante PCR [Science, 230, 1350 (1985)]. En particular, cuando es difícil obtener de la biblioteca un cADN de longitud completa, pueden utilizarse apropiadamente el procedimiento RACE [Rapid amplification of cDNA ends; Jikken Igaku, 12 (6), 35 (1994)], particularmente el procedimiento 5'-RACE [M.A. Frohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 8, 8998 (1988)].  
35

El cebador utilizado para el procedimiento PCR puede diseñarse óptimamente basándose en la información secuencial de la molécula de ADN de SY-001 que se demuestra en el Ejemplo que se describe a continuación y sintetizado de acuerdo con el procedimiento estándar. Como este cebador, es también posible utilizar porciones de  
40 ADN (cebador, promotor SP6 y cebador finalizador T7) que se añaden a ambos extremos del cADN de un plásmido vector, en el que el cADN de SY-001 se ha incorporado tal como se muestra en el Ejemplo que se describe a continuación.

El fragmento ADN/ARN amplificado mediante el procedimiento PCR, puede aislarse y purificarse según los procedimientos estándares, por ejemplo, un procedimiento de electroforesis en gel.  
45

La molécula de ADN de SY-001 y varios de sus fragmentos de ADN obtenidos como anteriormente, pueden secuenciarse según el procedimiento estándar, por ejemplo, un procedimiento dideoxi [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)] o un procedimiento Maxam-Gilbert [Methods in Enzymology, 65, 499(1980)] o simplemente, utilizando un equipo de secuenciación comercialmente disponible.  
50

4) Producción genomanipulada del polipéptido de la presente invención.

Los polipéptidos recombinantes SY-001 de la presente invención pueden producirse fácil y establemente en gran cantidad como el producto expresado de la molécula de ADN de la proteína que lo contiene, utilizando la información  
55 secuencial de la molécula de ADN de SY-001, según las técnicas habituales de ingeniería genética [e.g., Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692(1985); proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 5990(1983)]. Más particularmente, el polipéptido de la presente invención puede obtenerse preparando un ADN recombinante (vector de expresión) que puede expresar el ADN que codifica el proteína deseada en una célula huésped transformando la célula huésped con este vector para obtener un transformante, cultivando éste y recuperando la  
60 proteína objetivo a partir del cultivo resultante.

En la producción del polipéptido de la presente invención, cualquiera de los organismos procarióticos y de los eucarióticos pueden utilizarse como la célula huésped. Por ejemplo, el organismo procariótico como el huésped puede ser cualquiera de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y los semejantes generalmente utilizados. Pueden utilizarse apropiadamente *Escherichia coli*, particularmente la cepa K12 de *Escherichia coli*. Las células huéspedes de los organismos eucarióticos incluyen células de los vertebrados y de las levaduras. Los primeros ejemplos  
65

incluyen apropiadamente células COS de monos [Cell, 23: 175(1981)], células ováricas de hámster chinos y su progenie de delección de la dihidrofolato reductasa [Proc. Natl. Sci. USA, 77:4216(1980)], y los últimos ejemplos incluyen apropiadamente células de levadura que pertenecen al género *Saccharomyces*. Las células huésped no están, por supuesto, limitadas.

5 Cuando la célula procariótica se utiliza como huésped, utilizando un vector que puede llevar a cabo la replicación en la célula huésped, es posible utilizar apropiadamente un plásmido de expresión obtenido incorporando un promotor y la secuencia SD (Shain and Dalgarno) y un codón de iniciación (por ejemplo, ATG) que se requiere para la iniciación de la síntesis proteica por encima del gen de la presente invención, de forma que el gen puede expresarse en este vector como el vector anterior, se utilizan a menudo, generalmente, plásmidos tales como pET-16b, pET-32, pBR322, pBR325, pUC12 y pUC13 derivados de *Escherichia coli*. Sin estar limitados, pueden utilizarse otros diversos vectores conocidos. Ejemplos del vector comercialmente disponible utilizado para un sistema de expresión que utiliza *Escherichia coli*, incluyen pGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech), pMAL-C2, pMAL-P2 (New England Biolabs), pET-16, pET-32, pET-21, pET-21/lacq (invitrogen) y pBAD/His (Invitrogen).

10 El vector de expresión cuando se utiliza una célula de vertebrados como huésped, incluye los que presentan típicamente el promotor, un sitio de corte y empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, y una secuencia de finalización de la transcripción localizada por encima del gen de esta invención que va a expresarse. Si es necesario, estos pueden tener además un origen de replicación. Específicamente, los ejemplos del vector de expresión, incluyen pSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854(1981)], que presentan un promotor temprano de SV40. Además de lo anterior, pueden utilizarse diversos vectores conocidos comercialmente disponibles. Los ejemplos de vectores comercialmente disponibles utilizados para el sistema de expresión que utiliza la célula animal, incluyen vectores tales como pEGFP-N, pEGFP-C (Clontech), pIND (Invitrogen) y pcDNA3.1/His (Invitrogen) para células animales, y los vectores tales como pFastBac HT (GibcoBRL), pAcGHLT (PharMingen), pAc5/V5-His, pMT/V5-His y pMT/Bip/V5-his (Invitrogen) para las células de insectos.

15 Como vector para las células de insectos, es posible ejemplificar un vector baculovírico (Takara) en el cual se incorporó cADN de SY-001. Específicamente, el polipéptido de la presente invención puede obtenerse introduciendo el vector baculovírico de expresión en el que se ha incorporado cADN de SY-001, en células cultivadas BmN4 o larvas del gusano de la seda (*Bombyx mori*), utilizando el virus de la polihedrosis nuclear (BmNPV) de éste, para expresarlo y aislarlo a partir de un medio de cultivo o de un fluido corporal del gusano mediante cromatografía. El polipéptido de la presente invención puede obtenerse asimismo incorporando el cADN de SY-001 en el virus de la polihedrosis nuclear (AcNPV) de *Autographa californica*, expresándolo en las células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* o en las células Tn5 de *Trichoplusia ni*, y purificándolo de este modo a partir de un sobrenadante de un cultivo mediante cromatografía.

20 Los ejemplos específicos del vector de expresión cuando la célula de levadura se utiliza como huésped, incluyen pAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80: 1(1983)], que presenta el promotor para el gen de la fosfatasa ácida. Los ejemplos del vector de expresión comercialmente disponible para las células de levadura, incluyen pPICZ (Invitrogen) y pPICZ $\alpha$  (Invitrogen).

25 El promotor no está particularmente limitado. Cuando una bacteria que pertenece al género *Escherichia* se utiliza como huésped, es posible utilizar preferentemente el promotor (*trp*) de triptófano, el promotor *lpp*, el promotor *lac*, el promotor *recA* y el PL/PR. Cuando el huésped pertenece al género *Bacillus*, resultan preferidos los promotores SP01, SP02, *penP* y similares. Cuando la levadura se utiliza como huésped, es posible utilizar apropiadamente los promotores pH05, PGK, GAP, ADH y similares. Los promotores preferidos cuando se utiliza como huésped, la célula animal, son el promotor derivado de SV40, el promotor del retrovirus, el promotor metalotioneínico, el promotor de choque térmico, el promotor citomegalovírico, el promotor SR $\alpha$  y similares. Cuando se utilizan las células de insectos como huéspedes, es posible proporcionar a título de ejemplo el promotor baculovírico p10, el promotor polihedrírico y similares.

30 Como el vector de expresión de la molécula de ADN de SY-001, puede utilizarse preferentemente un vector de expresión para una proteína de fusión. Los ejemplos específicos del vector incluyen pGEX (Promega) para expresar como proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa (GST).

35 Como la secuencia polinucleótida correspondiente a una secuencia codificante en el polipéptido maduro, que ayude a la expresión y secreción del polipéptido a partir de la célula huésped, es posible proporcionar a título de ejemplo una secuencia secretoria y una secuencia líder. Estas secuencias incluyen secuencias marcadores (señalización hexahistidínica, señalización histidínica), por ejemplo: señalización hemaglutinínica en el caso de la célula animal, utilizada para la purificación del polipéptido maduro fusionado en el huésped bacteriano.

40 El procedimiento para introducir el ADN recombinante deseado (vector de expresión) en la célula huésped y el procedimiento para transformar con éste, no están limitados particularmente, pudiéndose utilizar varios procedimientos generales.

El transformante resultante puede cultivarse según los procedimientos estándares, y mediante el cultivo, la proteína objetivo codificada por la molécula de ADN del SY-001 diseñado tal como se desea, se expresa y produce (acumulado y secretado) intracelularmente o extracelularmente, o sobre una membrana celular en el transformante.

5 El medio utilizado para el cultivo, puede seleccionarse opcionalmente de forma habitual, y utilizarse, dependiendo de la célula huésped utilizada. El cultivo puede llevarse también a cabo bajo condiciones apropiadas para el crecimiento de la célula huésped.

10 El polipéptido (proteína recombinante) de la presente invención obtenida de esta manera, puede separarse y ser purificado mediante diversas manipulaciones de separación [ver Biochemistry Data Book II, páginas 1175-1259, primera edición, primera impresión, publicada por Tokyo Kagaku Dojin el 23 de junio de 1980; Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313(1987) que utiliza su naturaleza física y química tal como se desea.

15 Dichos procedimientos incluyen específicamente el tratamiento habitual de reordenamiento, tratamiento (desalado) mediante un agente de precipitación proteica, centrifugación, choque osmótico, tratamiento con ultrasonidos, ultrafiltración, varios procedimientos de cromatografía líquida, tales como la cromatografía molecular mediante criba (filtración en gel), cromatografía de absorción y cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), diálisis y sus combinaciones. El procedimiento particularmente preferido incluye la cromatografía de afinidad utilizando una columna a la que se ha unido el anticuerpo específico para SY-001.

20 Cuando el polinucleótido que codifica SY-001 se diseña, es posible utilizar la secuencia de ADN de la molécula de ADN de SY-001 de SEC ID nº:2. En la secuencia, también se puede seleccionar opcionalmente, cambiar y utilizar el codon para cada residuo aminoácido, tal como se desee.

25 En la secuencia de aminoácidos de SY-001, cuando una parte de los residuos aminoácidos o de la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustitución, inserción, delección o adición, puedan utilizarse varios procedimientos descritos anteriormente de mutagénesis puntual.

30 (5) Polipéptido de la presente invención que es un componente activo de la composición farmacéutica de la presente invención.

35 El polipéptido (y el mismo polipéptido utilizado para el procedimiento de cribado de la presente invención), de la presente invención que es el componente activo de la composición farmacéutica de la presente invención, puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética que se muestran en (4) anteriormente.

40 La actividad inhibidora del polipéptido de esta invención sobre la agregación plaquetaria, es la misma que la definida para la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001 que se describe anteriormente (1). Esta actividad inhibitoria puede determinarse según el procedimiento de prueba de la agregación plaquetaria conocido públicamente, por ejemplo, por el procedimiento de determinación de la agregación del plasma rico en plaquetas (PRP) utilizando el agregómetro plaquetaria turbidimétrico mediante transmisión de luz.

45 Más particularmente, la actividad inhibitoria de agregación plaquetaria del polipéptido de la presente invención sobre la agregación plaquetaria, puede determinarse y evaluarse midiendo el nivel de la agregación plaquetaria, añadiendo el agente de agregación plaquetaria al PRP preparado a partir de la sangre humana en presencia o ausencia de SY-001, utilizando el agregómetro plaquetario turbidimétrico transmisor de luz, y calculando la tasa de inhibición de la agregación plaquetaria SY-001 a partir de la curva de agregación plaquetaria.

50 La actividad inhibitoria del polipéptido de la presente invención sobre la adhesión plaquetaria es la misma que la definida para la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria (es decir, la inhibición de la adhesión plaquetaria al colágeno), de SY-001 descrita anteriormente (1). Esta actividad inhibitoria puede determinarse según el procedimiento de prueba de la adhesión plaquetaria al colágeno conocida públicamente, por ejemplo, mediante el procedimiento de determinación de la adhesión plaquetaria al colágeno, utilizando el equipo del ensayo proteico de (BIO-RAD Laboratories).

55 Más particularmente, la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria del polipéptido de la presente invención sobre la adhesión plaquetaria al colágeno, puede determinarse y evaluarse midiendo el nivel de la adhesión plaquetaria al colágeno añadiendo la suspensión plaquetaria preparada a partir de la sangre humana, en presencia o ausencia de SY-001 utilizando el kit de ensayo de la proteína Dc, y calculando la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria de SY-001 a partir de su curva de adhesión plaquetaria.

60 La capacidad de unión del colágeno sobre el polipéptido de la presente invención, es la misma que la definida para la capacidad de unión del colágeno (es decir, SY-001 se une al colágeno) del SY-001 descrito anteriormente (1). Esta capacidad de unión del colágeno puede determinarse según el procedimiento de prueba de unión del colágeno conocido públicamente, por ejemplo, por el procedimiento de determinación de la capacidad de unión del colágeno utilizando un lector de Micro Placa con un cambio en la absorbancia a 405-410 nm.

Más particularmente, la capacidad de unión del colágeno al polipéptido de la presente invención sobre la unión del colágeno, puede determinarse y evaluarse midiendo el nivel de la capacidad de unión del colágeno de SY-001 añadiendo SY-001 a concentraciones dadas, en presencia o ausencia de colágeno, utilizando el lector de la microplaca con un cambio en la absorbancia a 405-410 nm y calculando la capacidad de unión del colágeno del SY-001 a partir de la curva de unión del colágeno.

La composición de esta invención es útil como agente terapéutico o preventivo para estados patológicos subsiguientes a enfermedades y sus complicaciones, por ejemplo, síndrome coronario agudo, infarto miocárdico, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, insuficiencia cardíaca, nefritis, fallo renal y hemorragia subaracnoidea, causados por la formación de trombos o émbolos, por la actividad inhibitoria del polipéptido de la presente invención sobre la agregación plaquetaria y o la adhesión plaquetaria, basada en comprender el polipéptido de la presente invención como componente activo. La composición de esta invención es también útil para la prevención de la formación de trombos después de situar PTCA y la endoprótesis vascular como agente preventivo de la restenosis mediante su plegamiento o aplicándola o integrándola.

(6) Síntesis química de SY-001 que es un componente activo de la composición farmacéutica de la presente invención.

El polipéptido (SY-001), que es el componente activo de la composición farmacéutica de la presente invención, puede obtenerse también mediante el procedimiento general de síntesis química, de acuerdo con la información secuencial aminoácida de SEC ID nº: 3. El procedimiento incluye procesos de síntesis peptídica mediante actuaciones habituales en fase líquida o en fase sólida. Los procedimientos de síntesis peptídica incluyen uno llamado de alargamiento, paso a paso, en el que cada aminoácido se sintetiza secuencialmente y se unen uno por uno para alargar la cadena, y un procedimiento de condensación de los fragmentos, en el que fragmentos que incluyan varios aminoácidos se sintetizan, acoplándose entonces los fragmentos respectivos. El SY-001 pueden sintetizarse por cualquiera de los mismos.

Un procedimiento de condensación utilizado para la síntesis peptídica, puede también llevarse a cabo según procedimientos estándares. Los ejemplos de éstos pueden incluir un método azídico, uno mezclado de anhídrido ácido, uno de DCC, uno de éster activo, uno de oxilación y reducción, uno de DPPA (difetil fosforilazida), un procedimiento de DDC + (1-hidroxibenzotriazol, N-hidrosisuccinamida, N-hidroxi-5-noborneno-2,3-dicarboximide), y los procedimientos Woodward.

Sobre la reacción anterior de síntesis peptídica el aminoácido que no está implicado en la reacción o el grupo carboxilo en el péptido, pueden protegerse como ésteres alquilo inferiores tales como éster metílico, éster etílico y éster tert-butilo, y éster aralquilo tales como éster bencílico, éster p-metoxibencilo, y éster p-nitrobencilo, generalmente mediante esterificación.

El grupo hidroxilo en el aminoácido tal como el residuo de tirosina, que presenta un grupo funcional en la cadena lateral, puede protegerse con grupos acetilo, grupo benzilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo terc-butilo, pero no siempre es necesario siempre protegerse. Además, por ejemplo, el grupo guanidino en el residuo de arginina puede protegerse con un grupo protector apropiado tal como nitro, tosilo, p-metoxibenceno sulfonilo, metileno-2-sulfonilo, benciloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo o grupo adamatiloxicarbonilo.

Una reacción de desprotección de estos grupos protectores en el aminoácido, el péptido y el polipéptido que es el componente activo de la composición farmacéutica obtenida eventualmente de la presente invención, que posee el grupo protector, puede llevarse a cabo según los procedimientos utilizados habitualmente tales como el procedimiento de reducción por contacto, y los procedimientos que utilizan amoniaco/sodio líquido, fluoruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico y similares.

Habiendo obtenido de esta forma el SY-001, que constituye el componente activo de la composición farmacéutica de esta invención, puede purificarse opcionalmente según los diversos procedimientos tales como los que utilizan las resinas de intercambio iónico, cromatografía de partición y cromatografía en gel, y un procedimiento de distribución a contracorriente que se utiliza habitualmente en el ámbito de la química de los péptidos.

(7) Composición farmacéutica de la presente invención

Es importante para la composición farmacéutica de la presente invención contener SY-001 o el polipéptido de la presente invención como componente activo. La composición farmacéutica es útil como tal, particularmente como un inhibidor de la agregación plaquetaria para inhibir o bloquear el estado en el que la sustancia que induce la agregación plaquetaria aumenta en los vasos sanguíneos humanos (particularmente en las arterias coronarias, aorta y las cerebrales, o como una capacidad de agregación de las plaquetas que se facilita en los vasos sanguíneos, o el

estado en el que se ha producido daño vascular en los vasos sanguíneos y las plaquetas se agregan de modo excesivo en el sitio dañado.

5 La composición farmacéutica es asimismo útil particularmente como inhibidor de la adhesión plaquetaria para inhibir o bloquear la adhesión plaquetaria a la sustancia como un agente de agregación tal como el colágeno en el cual la sustancia que induce la adhesión con las plaquetas en los vasos de la sangre humana (particularmente en la arteria coronaria aorta y arterias cerebrales) o se facilita una capacidad adhesiva de las plaquetas en los vasos sanguíneos, o el estado en el que el daño ha tenido lugar en los vasos sanguíneos y las plaquetas se agregan excesivamente al sitio dañado.

10 La composición farmacéutica de la presente invención es útil también como agente terapéutico o preventivo para estados patológicos subsiguientes a las patologías y sus complicaciones, por ejemplo, síndrome coronario agudo, infarto miocárdico, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, insuficiencia cardiaca, nefritis, fallo renal y hemorragia subaracnoidea causada por la formación de trombos o émbolos, aprovechando su actividad inhibitoria sobre la agregación y/o la adhesión plaquetaria.

15 El SY-001 o el polipéptido de la presente invención el cual es un componente activo en la composición farmacéutica de esta invención presenta la actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria y puede utilizarse para el procedimiento de las enfermedades asociadas con agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria en las células o tejidos diana aprovechando esta acción o actividad.

20 Los ejemplos de las células diana afectadas por tal agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria pueden incluir a células y plaquetas sanguíneas. Los ejemplos de los tejidos que incluyen estas células puede incluir vasos arteriales coronarios, vasos arteriales cerebrales, vasos arteriales cervicales, vasos arteriales, vasos venosos, vasos arteriales periféricos, vasos venosos periféricos, vasos arteriales renales y vasos arteriales hepáticos.

25 Según la actividad inhibitoria agregante de las plaquetas y/o la actividad inhibitoria de adhesión plaquetaria o la acción para inhibir la agregación plaquetaria y/o la acción para inhibir la adhesión plaquetaria en las células diana, que la composición farmacéutica de la presente invención presenta, es posible tratar o prevenir los estados patológicos subsiguientes para las enfermedades y sus complicaciones, por ejemplo, infarto miocárdico, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, insuficiencia cardiaca, nefritis, fallo renal y hemorragia subaracnoidea causada por la formación de trombos o émbolos.

30 Según la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria del SY-001 sobre la agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria es posible prevenir la formación de trombos sobre la PTCA y la colocación de las endoprótesis vasculares y prevenir las restenosis después de situar la prótesis vascular envolviendo la composición farmacéutica de la presente invención mediante, la aplicación sobre o la introducción en las mismas prótesis vasculares.

35 La composición farmacéutica de la presente invención para la prevención de la restenosis después de situar la prótesis puede utilizarse como un clatrato ciclodextrínico. La composición farmacéutica de esta invención puede también utilizarse aplicando (aplicando aproximadamente o rociando) sobre una resina biodegradable que es un material de las endoprótesis o situarlas sobre la misma endoprótesis.

40 El SY-001 o el polinucleótido que es el componente activo en la composición farmacéutica de la presente invención incluye también sus sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales sales incluyen sales metálicas alcalinas no tóxicas tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario y amoníaco, sales metálicas alcalinotérreas y sales amónicas. Estas sales pueden producirse según los procedimientos estándares. Las sales anteriormente mencionadas incluyen además sales de adición ácidas no tóxicas obtenidas mediante la reacción de SY-001 o el polipéptido de la presente invención con un ácido orgánico o inorgánico apropiado. Los ejemplos de las sales ácidas de adición no tóxicas incluyen clorhidrato, hipobromuro, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, malato p-toluenosulfonato (tosilato) citrato, fumarato, succinato, tartrato, sulfonato, glicolato, ascorbato, bencenosulfonato y napsilato.

45 La composición farmacéutica de la presente invención se prepara en una forma de formulación farmacéutica llevando a cabo el SY-001, el polinucleótido de la presente invención o su sal componente activo, y que contiene una cantidad farmacéuticamente efectiva junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente apropiado.

50 Como vehículo farmacéutico utilizado para la formulación farmacéutica, es posible proporcionar a título de ejemplo excipientes y diluyentes como rellenanates, y engrosadores, cementantes, humectantes, desintegrantes, activadores superficiales y lubricantes. Estos se seleccionan opcionalmente y se utilizan dependiendo de una forma de dosificación unitaria de la formulación resultante. La formulación farmacéutica particularmente preferida se prepara utilizando opcionalmente varios ingredientes, por ejemplo, un estabilizador, un agente germicida, un tampón, un

agente isotonicante, un agente quelante, un ajustador de pH, un surfactante y similares, utilizados para las formulaciones proteicas habituales.

5 Los ejemplos del estabilizador anterior incluye albúmina sérica humana, L-aminoácidos habituales, sacáridos y derivados de la celulosa.

Estos pueden utilizarse solos o combinados con el surfactante. Particularmente, mediante esta combinación, la estabilidad del componente activo se potencia además en algunos casos.

10 El L-aminoácido no está particularmente limitado, y pueden utilizarse cualquiera de los de glicina, cisteína, ácido glutámico y similares.

15 Los sacáridos no están particularmente limitados. Por ejemplo, los monosacáridos tales como glucosa, manosa, galactosa y fructosa, alcoholes azucarados, tales como manitol, inositol y xilitol, disacáridos tales como sacarosa, maltosa y lactosa, polisacáridos como dextrano, almidón hidroxipropílico, sulfato de condroitina y ácido hialurónico y sus derivados, pueden utilizarse.

20 El surfactante no está particularmente limitado y cualquiera de los surfactantes iónicos y no-iónicos, pueden utilizarse. Sus ejemplos específicos incluyen surfactantes basados en ésteres alquilo sorbitan polioxietilen glicol, en éteres polioxietilen alquilo, en ésteres sorbitaunoacilos y en glicéricos de ácidos grasos.

25 El derivado celulósico no está particularmente limitado. Pueden utilizarse metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosasódica y semejantes. Una cantidad de los sacáridos anteriores para añadir es de aproximadamente 0,0001 o más y preferentemente de aproximadamente 0,01 a 10 mg con respecto a 1 µg de compuesto activo. La cantidad del surfactante a añadir es de aproximadamente 0,00001 mg o más, y preferentemente de entre 0,0001 a 0,01 mg con respecto a 1 µg del componente activo, La cantidad de la albúmina sérica humana a añadir es de aproximadamente 0,0001 mg o más, y preferentemente de entre aproximadamente 0,001 a 0,1 mg con respecto a 1 µg del componente activo, La cantidad del L-amino ácido a añadir es apropiadamente de aproximadamente 0,001 a 10 mg con respecto a 1 µg del compuesto activo. La cantidad del derivado celulósico a añadir es de aproximadamente 0,0001 mg o más, y preferiblemente de aproximadamente 0,001 a 0,1 mg, con respecto a 1 µg del componente activo.

35 La cantidad del componente activo contenido en la formulación farmacéutica de la presente invención se selecciona opcionalmente de entre un amplio espectro. Es apropiado que la cantidad del componente activo es típicamente de aproximadamente 0,00001 a 70% en peso, y preferentemente de aproximadamente 0,0001 al 5% en peso, en la formulación.

40 Varios aditivos como tampones, agentes isotonicantes y agentes colantes, pueden añadirse a la formulación farmacéutica. Los ejemplos de tampones incluyen ácido bórico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ε-aminocaproico, ácido glutámico y/o sus sales (por ejemplo, sales metálicas alcalinas tales como sales sódicas, potásicas, cálcicas y magnésicas y sales metálicas alicalinotérricas. Los ejemplos del agente isotonicante incluyen cloruro sódico, cloruro potásico, sacáridos y glicerina. Los ejemplos del agente quelante incluyen acetato sódico y ácido cítrico.

45 La formulación farmacéutica puede prepararse como formulación de soluciones, y adicionalmente puede convertirse en una forma de dosificación liofilizada, obtenida mediante liofilización de la formulación farmacéutica, que se prepara con una apropiada concentración para su utilización, disolviendo en la solución salina contenedora del tampón.

50 La forma unitaria de dosificación de la formulación farmacéutica puede seleccionarse opcionalmente dependiendo de un propósito terapéutico. Sus ejemplos representativos incluyen formas sólidas de dosificación, tales como comprimidos, grageas, medicamentos en polvo, polvos, gránulos y cápsulas, y formas líquidas de dosificación tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Estas se caracterizan después en agentes orales, parenterales, nasales, vaginales, supositorios, sublinguales y pomadas, dependiendo de las vías de administración, y pueden combinarse, moldearse y prepararse según procedimientos habituales. Si es necesario, también pueden contenerse en la formulación farmacéutica de la presente invención agentes colorantes, conservantes, perfumes, aromas y edulcorantes y otros componentes farmacéuticos.

60 Un procedimiento de administración de la formulación farmacéutica no está limitado particularmente, y se determina dependiendo de varias formas de formulación, edad, género, de otras situaciones y de la gravedad de la patología de un paciente. Por ejemplo, los comprimidos, las grageas, los líquidos, las suspensiones, las emulsiones, los gránulos, y las cápsulas se administran oralmente.

65 Un agente inyectable se administra solo o mezclado, con líquido habitual de reemplazo como el glucosado, o con aminoácidos, administrado intravenosamente, si es necesario intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente o únicamente intraperitonealmente. Los supositorios se administran rectalmente. Los agentes

vaginales se administran vaginalmente, los nasales por la nariz, los sublinguales, en la boca, y las pomadas, percutáneamente de forma tópica.

Una dosis de la formulación farmacéutica no está particularmente limitada y se selecciona opcionalmente a partir de una amplia gama, dependiendo del efecto terapéutico deseado, del procedimiento de administración, de un período de tratamiento, de la edad, del género y de otras situaciones del paciente. Generalmente, resulta preferido que la dosis se determine de forma que la cantidad del componente activo sea típicamente de 0,01 µg a 10 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 µg a 1 mg por kilo de peso corporal por día. La formulación puede administrarse dividiendo la dosis entre una y varias veces al día o intermitentemente.

(8) Cribado de sustancias (agonistas) para facilitar la actividad inhibidora sobre la agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria.

La presente invención proporciona también el procedimiento para cribar los compuestos candidatos para facilitar la actividad inhibidora sobre la agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria.

El procedimiento se caracteriza por medir el nivel de la actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y/o de la actividad inhibidora de la adhesión plaquetaria del polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3 o el polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos que muestra un 70% o más de la homología para la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3 y que posee la actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibidora de la adhesión plaquetaria en presencia o ausencia de una sustancia objeto, y seleccionando la sustancia objeto que afecta a la actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y/o a la actividad inhibidora de la adhesión plaquetaria como el agonista. Comparando el valor de la medición en presencia de la sustancia objeto con el valor de la medición, en presencia de la sustancia objeto, con el valor de la medición en ausencia de la sustancia objeto.

El nivel de la acción inhibidora de la agregación plaquetaria, puede obtenerse mediante la tasa (o proporción) inhibidora de la agregación plaquetaria, calculada a partir de los valores de medición obtenidos utilizando el agregómetro plaquetario turbidimétrico de transmisión lumínica. Más particularmente, la muestra sanguínea humana se recupera utilizando la jeringuilla con el anticoagulante, y el plasma humano rico en plaquetas (PRP) se prepara a partir del conjunto de sangre recolectado mediante centrifugación. Una solución del SY-001 purificado, previamente disuelto en PBS, se añade a PRP, que se preincuba entonces a 37°C. A continuación, una solución de colágeno (proporcionada a partir de NYCOMED), como el agente agregante plaquetario, se añade entonces para agregar las plaquetas, continuándose la incubación durante un tiempo. Entonces se mide la capacidad transmisora de la solución, utilizando el agregómetro turbidimétrico plaquetario mediante la capacidad de transmisión de luz (MCM HEMA TRACER 313M: proporcionado por MC Medical), para obtener la curva de agregación plaquetaria. La proporción inhibidora de la agregación plaquetaria puede calcularse a partir de esta curva en cada caso de SY-001 o SY-001 + la sustancia individual. Como el agente agregante mencionado anteriormente, es posible utilizar ADP, CRP, convulxina, TRAP, epinefrina, ácido araquidónico U-46619, A23187 y similares, añadiéndolos al colágeno.

El nivel de la actividad inhibidora de la adhesión plaquetaria, puede conseguirse asimismo mediante la proporción inhibidora de adhesión plaquetaria calculada a partir de los valores de medición obtenidos utilizando el equipo de ensayo proteico DG (procedimiento de Lowry [Lowry, O., et al., *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)] BIO-RAD Laboratories). Más particularmente, la muestra sanguínea humana se recupera utilizando la jeringuilla con el anticoagulante, preparándose la suspensión plaquetaria humana a partir de PRP obtenido mediante centrifugación de la sangre total. Una solución de SY-001 purificado, disuelto previamente en PBS, se añadió a placas con 96 pocillos revestidos con colágeno, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadió la suspensión plaquetaria a los pocillos, y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la solución de ésta se eliminó con la pipeta de los pocillos, lavándose con PBS.

La solución PBS que contenía SDS al 1%, se añadió a los pocillos, secándose éstos con aire, después de agitar y remover. Entonces, se añadió a los pocillos agua destilada, midiéndose la cantidad de proteínas de cada pocillo utilizando el equipo Dc de ensayo proteico (BIO-RAD Laboratories), y se calculó la proporción de actividad inhibidora de la adhesión plaquetaria de SY-001 a partir de un valor de medición obtenido, basado en el valor en el control que no contiene SY-001 y calculando la actividad inhibidora de la adhesión plaquetaria de SY-001 a partir de su curva de adhesión plaquetaria. La proporción de inhibición de adhesión plaquetaria puede calcularse a partir de esta curva, en cada caso de SY-001 o SY-001 + sustancia objeto. Como inductor de la adhesión plaquetaria anterior, es posible utilizar colágeno.

La presente invención proporciona también el procedimiento para cribar la sustancia candidata con aumento de la actividad inhibidora de la agregación plaquetaria de SY-001, que incluye las siguientes etapas (1) a (4):

(1) etapa de preparación del medio de cultivo que incluye la transformación celular con el vector de expresión de SY-001 y el plasma rico en plaquetas (PRP);

(2) una etapa de inducción de la agregación plaquetaria, añadiendo la sustancia de agregación plaquetaria al medio de cultivo anterior (1) en presencia o ausencia de la sustancia objeto;

5 (3) una etapa de medición de los niveles de inhibición de agregación plaquetaria en presencia de la sustancia objeto y en ausencia de la sustancia objeto en (2); y

(4) una etapa de selección de la sustancia objeto como sustancia candidata, cuando el valor de medición en presencia de la sustancia es mayor que el valor de medición en ausencia de la sustancia objeto.

10 La presente invención proporciona también el procedimiento para cribar la sustancia candidato que aumenta la acción inhibitoria de la agregación plaquetaria del SY-001, que incluye las etapas siguientes (1) a (4):

(1) una etapa de preparación del medio de cultivo (en los pocillos) que incluye las células que contienen el producto expresado de esta invención y el plasma tico en plaquetas (PRP);

15 (2) una etapa de inducción de la agregación plaquetaria añadiendo la sustancia de la agregación plaquetaria en el medio de cultivo anterior (1), en presencia o ausencia de la sustancia objeto;

20 (3) una etapa de medición de los niveles de la inhibición de la agregación plaquetaria en presencia de la sustancia objeto y en ausencia de ésta en (2); y

(4) una etapa de selección de la sustancia objeto como la sustancia candidata cuando el valor de medición en presencia de la sustancia objeto es superior al valor de medición en ausencia de la sustancia objeto.

25 La presente invención proporciona además el procedimiento para el cribado de la sustancia candidato que determina la acción inhibitoria de la adhesión plaquetaria del polipéptido de esta invención que incluye las etapas siguientes (1) a (4):

30 (1) una etapa de preparación del medio de cultivo sobre los pocillos que incluye las células que contienen el polipéptido de la presente invención y el revestimiento de los pocillos de la placa con la sustancia que se adhiere a las plaquetas (es decir, colágeno);

35 (2) una etapa de inducción la adhesión plaquetaria añadiendo la suspensión plaquetaria al medio de cultivo del anterior (1) en presencia o ausencia de una sustancia objeto;

(3) una etapa de medición de los niveles de la inhibición de la adhesión plaquetaria en presencia de la sustancia objeto y en ausencia de la sustancia objeto en el (2) anterior; y

40 (4) una etapa de selección de la sustancia objeto como la sustancia candidata cuando el valor de medición en presencia de la sustancia objeto es superior al valor de medición en ausencia de la sustancia objeto.

45 El procedimiento de cribado de la presente invención puede llevarse a cabo aplicando prácticamente la tecnología del cribado de alto rendimiento. Según la aplicación práctica de esta tecnología, por ejemplo, en el cribado para un acelerador de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria, y/o de la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria, una preparación que incluye SY-001 y el ligando marcado del polipéptido) con cualquiera de una mezcla reactiva sintética, una fracción celular, una fracción sanguínea, por ejemplo, plasma rico en plaquetas o una suspensión plaquetaria, se incuba en presencia o ausencia de la sustancia objeto que va a cribarse. Si la sustancia objeto limita la acción de SY-001 o la antagoniza la acción de SY-001, se detecta por la disminución del ligando unido marcado. El nivel de actividad SY-001 puede detectarse mediante un sistema informativo de marcado colorimétrico (no se limita a esto), la incorporación de un gen informador responsable del cambio de actividad del polinucleótido o del polipéptido, o un ensayo de unión que se conoce públicamente en la técnica.

50 Un ensayo competitivo en el que SY-001 o el otro mutante [por ejemplo SY-001(151-269); SY-001(21-269)] y el otro inhibidor de la agregación plaquetaria (por ejemplo, el ácido acetilsalicílico, cilostazol), se combinan con el compuesto que está unido al mismo, puede utilizarse para cribar el compuesto candidato como acelerador de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la de la adhesión plaquetaria.

55 Un ensayo competitivo en el que SY-001 o el otro mutante [por ejemplo SY-001(151-269), SY-001(21-269)] y el otro inhibidor de la adhesión plaquetaria (por ejemplo, de ticlopidina), se combinan también con el compuesto que está unido al mismo, puede utilizarse para cribar el compuesto candidato como el acelerador de la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

60 La sustancia objeto (compuesto candidato) cribada mediante el procedimiento de cribado de la presente invención es el agonista de una manera muy similar del SY-001 como el acelerador de la actividad inhibitoria de agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

65

El agonista puede ser la sustancia que aumente la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria medida por su presencia en el sistema de rastreo de la presente invención.

5 Los ejemplos específicos de estas sustancias objeto incluyen oligopéptidos, proteínas, anticuerpos, moléculas de ARN, siARN, compuestos no peptídicos (compuestos sintéticos), productos fermentados, extractos celulares (extractos vegetales, extractos animales), y plasma. Estas sustancias pueden ser las que se desarrollaron nuevamente, o las ya conocidas.

10 Los ejemplos de la sustancia inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o de la sustancia inhibitoria de la adhesión plaquetaria, incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular, que se encuentran naturalmente o que son péptidos y polipéptidos sintéticos, o péptidos y polipéptidos preparados mediante tecnología de recombinación génica, que aumentan la actividad de SY-001 por su unión a éste. La molécula de ADN con sentido para la molécula de ADN que codifica SY-001, administrada directamente *in vivo* o en la forma que se inserta en el vector recombinante, se incluye también en la anterior sustancia inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o en la  
15 sustancia inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

La sustancia candidata que posee actividad para aumentar la actividad inhibitoria de agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de adhesión plaquetaria cribada de acuerdo con el procedimiento de cribado de la presente invención, se evalúa de la manera siguiente: es decir, la sustancia candidata que aumente o facilita la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria en un 20%, o más, aproximadamente, preferentemente en aproximadamente 30% o más, y más preferentemente en aproximadamente 50% o más, comparada con el control (ausencia de la sustancia objeto), puede evaluarse como el compuesto para facilitar la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.

25 El compuesto para facilitar la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria se cree que es útil como agente terapéutico o preventivo para estado patológico subsiguiente a enfermedades y sus complicaciones, por ejemplo, infarto de miocardio, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, fallo cardíaco, nefritis, fallo renal y hemorragia subaracnoidea causada por la formación de trombos o émbolos.  
30

Entre las sustancias que facilitan la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o la actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria, obtenidas mediante el procedimiento de cribado de la presente invención, se cree que existe también la sustancia en sí misma que posee la actividad para inhibir la agregación plaquetaria inducida por la sustancia agregante plaquetaria *in vivo*, y/o para inhibir la adhesión plaquetaria inducida por la sustancia adherente de las plaquetas *in vivo*, creyéndose que dicha sustancia es útil como inhibidor de la agregación plaquetaria y/o inhibidor de la adhesión plaquetaria en varios campos, incluyendo el farmacéutico.  
35

(9) Kit para el cribado

40 La presente invención puede proporcionar un kit para cribar el agonista para SY-001, caracterizado por que incluye el plasma rico en plaquetas, SY-001 (que incluye el polipéptido de la presente invención), y el agente de agregación plaquetaria como constituyentes.

45 El kit para cribar de la presente invención incluye (1) SY-001 (por ejemplo, el polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3 o el polipéptido de la presente invención (por ejemplo, el polipéptido de la molécula de ADN que codifica SY-001, de la secuencia de ADN de SEC ID n°: 4, (2), el medio de cultivo celular que incluye el plasma rico en plaquetas, y (3) el agente agregante plaquetario como ingredientes esenciales. De modo similar a los kits para cribado de este tipo, el kit puede incluir varios reactivos tales como medios de cultivo celular, diluyentes reaccionantes, agentes de tinción, tampones, soluciones para fijación y soluciones para lavado, como otros ingredientes opcionales.  
50

Los ejemplos específicos del kit de la presente invención incluyen los que comprenden los constituyentes siguientes 1 a 3. Constituyente 1; células (células que expresan SY-001, células cultivadas que incluyen células *Escherichia coli* o células de insectos transformadas con el polinucleótido (molécula de ADN) que codifica SY-001), cultivado en un disco de 60 mm con 0,5 a  $1 \times 10^5$  células/pocillo a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5%, utilizando el tampón MOPS que contiene EGTA-Na;  
55

Constituyente 2: sustancia (por ejemplo, ADP) para inducir la agregación plaquetaria; y  
60

Constituyente 3: plasma rico en plaquetas.

65 En el procedimiento de cribado que utiliza el kit para cribado de la presente invención, la tasa de inhibición de la agregación plaquetaria se detecta en el plasma rico en plaquetas por el campo visual de la unidad de pocillo de éste, en el que la sustancia de prueba (sustancia objeto, sustancia candidata a medicamento), se ha añadido. Entonces, la tasa de inhibición de la agregación plaquetaria se detecta en el pocillo en el que la sustancia de prueba no se

añadió: a continuación, se ensaya la diferencia significativa entre la primera tasa y la última. Estas mediciones y evaluación pueden realizarse según los procedimientos estándares.

5 La presente invención puede también proporcionar un kit para cribar el agonista para SY-001, caracterizado por que contiene el agente de adhesión plaquetaria (es decir, colágeno), SY-001 (que incluye el polipéptido de la presente invención) y la suspensión plaquetaria como constituyentes.

10 El kit de cribado de la presente invención comprende (1) SY-001 (por ejemplo, el polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 3, o el polipéptido de esta invención (por ejemplo, el polipéptido de la molécula del ADN que codifica SY-001 de la secuencia de ADN de SEC ID n°: 4, (2) la sustancia de adhesión plaquetaria (es decir, colágeno) y (3) la suspensión plaquetaria, como ingredientes esenciales. De modo similar a los kits de cribado de este tipo, el kit puede incluir varios reactivos como medios de cultivo celular, diluyentes, reactivos, tintes, tampones, soluciones de fijación y de lavado como otros ingredientes opcionales.

15 Los ejemplos específicos del kit de la presente invención, incluyen los que comprenden los constituyentes 1 a 3;

20 Constituyente 1: células (células que expresan SY-001, células cultivadas que comprenden *Escherichia coli* o células de insectos transformadas con el polinucleótido (molécula de ADN) que codifica SY-001) cultivadas en una placa de 60 mm a 0,5 a  $1 \times 10^5$  células/pocillo) a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5% utilizando tampón de PBS;

25 Constituyente 2: la sustancia adherente a las plaquetas (por ejemplo, colágeno, ADP) para inducir la adhesión plaquetaria; y

30 Constituyente 3: suspensión de las plaquetas.

En el procedimiento de cribado que utiliza el kit de cribado de la presente invención, la tasa de inhibición de la adhesión plaquetaria se detecta como el nivel de la adhesión plaquetaria al colágeno por campo visual unitario del pocillo, en el que la sustancia de prueba (sustancia objeto, sustancia candidato al medicamento), se añadió. Entonces, la tasa de inhibición de la adhesión plaquetaria se detecta en el pocillo en el que la sustancia de ensayo no se añadió. Subsiguientemente, la diferencia significativa se ensaya entre la primera tasa y la última. Estas mediciones y la evaluación, pueden llevarse a cabo según los procedimientos estándares.

### Ejemplos

35 La presente invención se describe con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Dichos ejemplos son proporcionados a título de ejemplo no limitativo de la presente invención.

#### Ejemplo 1

40 1. Preparación de la biblioteca cADN a partir de la glándula salival en *Anopheles stephensi*

45 Se hizo que hembras de *Anopheles stephensi* (cepa SDA500) de 3 a 7 días después de la eclosión succionaran sangre en una cepa BALB/c de ratón conseguida de CLEA Japan Inc.). Las alas, las patas, una porción cefálica y una abdominal se eliminaron de los mosquitos 6 horas después de succionar la sangre, y sólo se almacenó en nitrógeno líquido una parte del pecho que incluía la glándula salivar. Cuando las porciones torácicas de 300 mosquitos se recuperaron. Se extrajo ARN utilizando el equipo Rneasy Midi (QIAGEN). Se obtuvo una biblioteca coleccionando poli A-ARN añadido, obteniendo el cADN utilizando la transcriptasa inversa, y añadiendo sitios de enzimas de restricción (sitios EcoRI y HindIII) en ambos finales e incorporando en kits de clonación λ SCREEN-1(Novagen).

50 (2) Inmuncribado de la biblioteca cADN de la glándula salival

55 *Escherichia coli* (ER-1647, Takara) se infectó con cada fago de la biblioteca anterior, y se criba utilizando un anticuerpo anti-*Anopheles stephensi* de su glándula salival, como sonda. El anticuerpo anti-*Anopheles stephensi* de su glándula salival se obtuvo inmunizando un conejo con un homogenado de la glándula salival de *Anopheles stephensi* junto al adyuvante de Freund.

60 Se infectó y amplificó en *Escherichia coli* ER-1647 en un clon positivo obtenido mediante el cribado. Entonces, se eliminó el fago, clonándose una porción insertada en un plásmido pSCREEN-1b(+) (Novagen), utilizado CreMediated Plasmid Excision (Novagen). Una secuencia básica de la porción insertada se secuenció utilizando porciones de ADN cebador promotor SP6: SEC ID n°: 10, código del producto No. TKR3867, Takara Bio, y cebador finalizador T7: SEC ID n°: 11, código del producto No. NV432, Novagen) y añadidas a ambos extremos de pSCREEN, utilizando el Analizador Genético 310 provisto por ABI.

65 Como resultado del análisis de la secuencia de bases, se descubrió que un fragmento génico clonado, contenía un codon de detención, pero no contenía (estaba eliminado) un codon de iniciación. Con objeto de obtener la región

eliminada del extremo 5' de SY-001 cADN, se llevó a cabo un procedimiento 5'-RACE [Frohman, M.A., et al., PNAS, 8, 8998-9002 (1988)], utilizando un ADN fágico  $\lambda$  extraído de la biblioteca cADN de la glándula salival, como plantilla y utilizando cebadores el cebador promotor SP6 (SEC ID n°: 10 y el cebador pAnS-1 de SEC ID n°: 12, para clonar un fragmento de ADN de aproximadamente 470 pares de bases. Este fragmento de ADN se solapó con el fragmento de ADN obtenido en el cribado anterior, y que contenía además el codon de iniciación. Los dos fragmentos de ADN se unieron para determinar la secuencia básica completa de la molécula de ADN que codifica SY-001.

Un ORF que se encontró en el cADN codificó 269 residuos aminoácidos de una proteína putativa de 28,5 kDa, y que contenía 807 pares de bases. Se predijo que esta proteína era la secretada como la salida, ya que se predijo a partir de la secuencia de aminoácidos deducida que ésta proteína constituía una proteína ácida con  $pI = 3,8$ , siendo hidrófobos 21 residuos aminoácidos en el extremo N, y que mostraban una secuencia semejante a un péptido-sígnal, no poseyendo el extremo C una región de anclaje membranoso.

Esta secuencia de aminoácidos deducida se muestra en SEC ID n°: 5. La secuencia de bases de la molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID n°: 6.

3. Expresión de SY-001 mediante ADN recombinante y su purificación.

(1) Producción de SY-001 (22-269)

Un fragmento de ADN que codifica los residuos aminoácidos en las posiciones 22 a 269 de SY-001 (SEC ID n°: 5), se amplificó mediante PCR. El cADN de la glándula salival que se muestra en 1 anterior, se utilizó como matriz. El cebador pAnSG-F7 (SEC ID n°: 13) utilizado comprendía el sitio NcoI (CCATGG) en los sitios 3° a 8° del extremo 5', y el cebador pAnSR-R1 (SEC ID n°: 14) utilizado comprendía el sitio NotI (GCGGCCGC) en los sitios 2° al 9° del extremo 5'. Entonces, el fragmento de ADN se clonó en pENTR/D-TOPO (Invitrogen), para construir el plásmido pENTR-SY-001-Exon 1-4.

A continuación un fragmento ADN de SY-001 (de aproximadamente 760 pares de bases), obtenido fragmentando pENTR-SY-001-Exon 1-4 con NcoI y NotI, se insertó en el sitio NcoI/NotI de pET32-b(+) (Novogen) para construir el plásmido de pET32-SY-001-Exon 1-4.

*Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen) se transformó con este pET32-SY-001-Exon 1-4, y el transformante resultante se cultivó, con agitación, en 6 ml de medio LB (LBA) que contenía 50  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina durante 15 horas a 37°C. Entonces, el medio cultivado se añadió a 600 mL de LBA, que se cultivó entonces agitando 4 horas a 37°C. Subsecuentemente, 6 mL de 100 mM IPTG se añadieron al medio de cultivo, que se cultivó posteriormente, agitando durante 4 horas a 37°C. El medio de cultivo resultante se centrifugó a 6.000 xg durante 15 minutos, eliminándose un sobrenadante. Un sedimento resultante se lisó añadiendo allí 40 mL de clorhidrato de guanidina 6 M. Una solución bacteriana resultante se centrifugó a 30.000 xg durante 25 minutos, recuperándose el sobrenadante. Se le añadieron 1,8 mL de Ni-NTA (QIAGEN), que se agitó entonces durante 15 horas a 4°C. La mezcla se centrifugó a 3.000 xg durante 3 minutos, eliminándose el sobrenadante, recuperándose Ni-NTA. Al Ni-NTA recogido, se le añadió una solución 6 M urea-TBS (6 M urea, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH7,5] que contenía 10 mM de imidazol. La mezcla resultante se centrifugó a 3.000 xg durante 3 minutos, eliminándose el sobrenadante. El Ni-NTA se empaquetó en una columna.

La proteína SY-001 Exon 1-4 se eluyó a partir de la columna de la manera siguiente: es decir, 2 mL de las soluciones 6 M urea-TBS que contenían 20 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM, respectivamente, se hicieron correr secuencialmente a través de la columna, recuperándose las fracciones respectivas. Una porción de cada fracción se sometió a electroforesis sobre SDS-PAGE 12%, tiñéndolo entonces con Coomassie para determinar la fracción que contenía la proteína SY-001 Exon 1-4. Esta fracción se dializó contra PBS durante 48 horas. La cantidad de la proteína se cuantificó utilizando el equipo del Ensayo Proteico BCA (PIERCE), siendo el rendimiento de 5,0 mg.

La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante obtenida de esta forma, fue tal como se muestra en SEC ID n°: 7. La secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a 162 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 410 a 420 son las secuencias de aminoácidos derivadas de una proteína tioredoxina, y de pET32-b(+) que contenía una secuencia His de señalización, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SY-001 (de 22 a 269) de la presente invención se localizó en las posiciones 162 a 409.

(2) Producción de SY-001 (148-269)

PCR con pET32-SY-001 Exon1-4 preparado en el (1) anterior como la matriz se llevó a cabo utilizando los cebadores pAnSG-F8 (SEC ID n°: 15) y pAnSG-R1 (SEC ID n°: 14). El fragmento de ADN resultante (382 pares de bases), se clonó en pENTR/D-TOPO (Invitrogen) para construir el plásmido pENTR-SY-001 Exon 3-4). El plásmido pENTR-SY-001 Exon 3-4 se fragmentó con NcoI/NotI para obtener el fragmento de ADN de 372 pares de bases. Éste se insertó en los sitios NcoI/NotI de pET32 (b) + (Novagen) para construir el plásmido pET32-SY-001 Exon 3-4.

*Escherichia coli* BL21 (D3) (Novagen) se transformó con el pET32-SY-001-Exon 3-4 obtenido anteriormente, y el transformante resultante se cultivó con agitación en 6 mL de medio LB (LBA) que contenía 50 µg/mL de ampicilina durante 15 horas a 37°C. Entonces, el medio cultivado se añadió a 600 mL de LBA, que se cultivó con agitación durante 4 horas a 37°C. A continuación, 6 mL de 100 mM >IPTG se añadieron al medio de cultivo, que se cultivó posteriormente agitando durante 4 horas a 37°C. El medio de cultivo resultante se centrifugó a 6.000 xp durante 15 minutos, eliminándose el sobrenadante. El sedimento resultante se lisó añadiendo 40 ml de clorhidrato de guanidina 6 M. La solución bacteriana resultante se centrifugó a 30.000 xg durante 25 minutos, recuperándose el sobrenadante. Se le añadió 1,8 mL de Ni-NTA (QIAGEN), que se agitó entonces durante 15 horas a 4°C. La mezcla se centrifugó a 3.000 xg durante 3 minutos, eliminándose el sobrenadante y recuperándose Ni-NTA. La solución de 6 M urea-solución TBS (6 M urea, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl [pH7,5]) que contenía 10 mM de imidazol, se añadió a Ni-NTA recogida. La mezcla resultante se centrifugó a 3.000 xg durante 3 minutos, eliminándose el sobrenadante. El Ni-NTA resultante se empaquetó en la columna.

La proteína SY-001 Exon 3-4 se eluyó a partir de la columna de la forma siguiente. Es decir, 2 ml de las secuencias de 6M urea-TBS que contenían 20 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM de imidazol, se procesaron secuencialmente respectivamente a través de la columna, recuperándose las fracciones respectivas. Una porción de cada fracción se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 12%, tiñéndose entonces con Coomassie para determinar la fracción que contenía la proteína SY-001 Exon 3-4. Esta fracción se dializó contra PBS durante 48 horas. La cantidad de la proteína se cuantificó utilizando el kit del Ensayo Proteico BCA (PIERCE), siendo el rendimiento de 1,8 mg.

La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante que se obtuvo de esta forma, fue tal como se muestra en SEC ID nº: 8, y tenía la secuencia de aminoácidos que contenía 293 residuos aminoácidos. En esta secuencia de aminoácidos, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a160 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 283 a 293, son las secuencias de aminoácidos derivadas de una proteína tioredoxina, y pET32-b(+) que contenía una secuencia His de señalización, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de SY-001 (148 a 269) se localiza en las posiciones 161 a 282.

## Ejemplo 2

Producción de SY-001 (21-269) recombinante, utilizando un sistema de expresión baculovírico

(1) Producción del baculovirus SY-001 (21-269)

Un fragmento de ADN que codifica el polipéptido en las posiciones 21 a 269 de SY-001 (SEC ID nº: 1), se amplificó mediante PCR utilizando cADN de la glándula salival que se muestra en el Ejemplo 1, 1 como la matriz. El cebador pAnSG-F10 (SEC ID nº: 16) utilizado tenía el sitio BamHI (GGATCC) entre el 5º y el 10º sitios desde el extremo 5 y una secuencia FLAG entre los sitios 12G y el 41A. El cebador pAnSG-R1(SEC ID nº: 14) utilizado tenía el sitio Not I (GCGGCCGC) y entre los sitios 2º y 9º a partir del extremo 5. El fragmento de ADN se clonó en pENTR/D-TOPO (Invitrogen) para construir el plásmido pENTR-SY-001-Exon 1-4.

A continuación un fragmento SY-001 (de 780 pares de bases), obtenido fragmentando pENTR-SY-001-Exon 1-4 con BamHI/NotI se insertó en los sitios BamHI/NotI de pBACgus-1 (Novagen), para construir un plásmido vector baculovírico de transferencia pBACgus-SY-001-Exon 1-4.

El baculovirus recombinante se obtuvo utilizando un equipo para obtener un baculovirus recombinante (BacVector-2000 Transfection Kit, Novagen), mediante cotransfección de células Sf9 con el plásmido vector baculovírico de transferencia pBACgus-SY-001-Exon 1-4 y el BacVector-2000 ADN. El baculovirus recombinante preparado se denominó AcNPV-SY-001-Exon 1-4.

Es decir, las células Sf9 se cultivaron en una cantidad de  $1 \times 10^7$  células por disco de Petri de 150 mm, infectándose con AcNPV-SY-001 Exon 1-4 una multiplicidad inferior de aproximadamente 5. Después de 3 a 4 días aproximadamente 250 ml del sobrenadante del cultivo, se recogieron entre 10 y 150 dosis de Petri añadiéndose 1,5 mL de Ni-NTA (QIAGEN), que se agitó entonces durante 15 horas a 4°C. La mezcla se centrifugó a 3.000 xg durante 3 minutos, descartándose el sobrenadante Ni-NTA se recogió y 50 mL de una solución TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH7,5]), que contenía 10 mM de imidazol, se añadió. La mezcla resultante se centrifugó posteriormente a 3.000 xg durante 3 minutos, descartándose el sobrenadante. El Ni-NTA obtenido se empaquetó en la columna.

La proteína SY-001 Exon 1-4 se eluyó a partir de la columna, de la siguiente forma. Es decir, 2 mL de las soluciones que 20 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM de imidazol, respectivamente, se procesaron secuencialmente a través de la columna, recogiendo las fracciones respectivas. Una porción de cada fracción se sometió a electroforesis sobre SDS-PAGE al 12%, tiñéndose entonces con tinción Coomassie, para determinar la fracción que contenía la proteína SY-001 Exon 1-4. Esta fracción se dializó contra PBS durante 48 horas. La cantidad de la proteína se cuantificó utilizando el equipo del Ensayo Proteico BCA (PIERCE), siendo el rendimiento de 0,8 mg

La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante SY-001 (21-269) obtenida de esta forma, se muestra en SEC ID nº: 9. En la secuencia, la secuencia en las posiciones 1 a 10 es la secuencia FRAG, la secuencia de

aminoácidos en las posiciones 11 a 259 es la secuencia de SY-001 (21-269), y la secuencia en las posiciones 260 a 270 es la secuencia derivada de pBACgus-1, que contiene la secuencia His de señalización.

### Ejemplo 3

5 La acción inhibitoria de SY-001 sobre la agregación plaquetaria, se evaluó midiendo la agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas (PRP), utilizando un agregómetro turbidimétrico de la transmitancia lumínica, plaquetaria.

10 Un esquema del procedimiento es como se expone a continuación. Es decir, en primer lugar se recuperó una muestra sanguínea de un donante sano, utilizando una jeringuilla con anticoagulante, preparándose el plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación de la sangre entera recogida. El PRP preparado se mezcló y preincubó con una solución SY-001 [solución de PBS en la que SY-001 posee la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 7 preparada en el Ejemplo 1, 3-(1) que se había disuelto] o PBS como control, agregándose a continuación las plaquetas añadiendo un agente agregante plaquetario. Como agente agregante plaquetario, el ADP (proporcionado por Sigma), el colágeno (proporcionado por NYCOMED), CRP (proporcionado por Peptide Institute Inc.), la convulsina (proporcionado por Alexis), TRAP (proporcionado por Sawaday Technology Co.), epinefrina (proporcionado por Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), ácido araquidónico (proporcionado por Sigma), U-46619 (proporcionado por Cayman), o A23187 (proporcionado por Sigma), se utilizaron respectivamente.

20 Entonces, la tasa de agregación plaquetaria se midió durante 5 minutos utilizando el agregómetro plaquetaria turbidimétrico de transmitancia lumínica (MCM HEMA TRACER 313M: proporcionado por MC Medical), obteniéndose la máxima tasa de agregación en la medición durante 5 minutos. La tasa de inhibición de la agregación plaquetaria (%) de SY-001 se calculó según la fórmula siguiente:

25 Tasa de inhibición de agregación plaquetaria (%) =  $(1 - As/AC) \times 100$ , en la que

As = Tasa máxima agregación plaquetaria en PRP con SY-001

Ac = Tasa máxima de agregación plaquetaria en PRP solo como control.

30 Los detalles de la manipulación anterior son tal como se muestra en los siguientes apartados (a) a (c).

(a) En primer lugar, 60 mL de sangre se recogieron de los donantes sanos utilizando la jeringuilla con 6 mL de 3,8% citrato sódico como coagulante. A continuación, se centrifugó la sangre a 1.100 rpm, durante 10 minutos, y una capa de un plasma humano rico en plaquetas (PRP), capa como la superior, se transfirió a otro tubo de ensayo. Una porción de la capa inferior que permanecía, se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, y una capa amarilla clara resultante superior (plasma pobre en plaquetas, PPP), se transfirió a otro tubo de prueba. La mezcla en la que el número de plaquetas se había ajustado a  $3 \times 10^8$ /mL se obtuvo mezclando PRP y PPP obtenidos anteriormente y que se utilizaron en la medición subsiguiente. Se hace referencia a esta mezcla como "una muestra de medición PRP" en la medición siguiente.

La tasa de agregación plaquetaria del agregómetro plaquetario, se fijó de forma que la transmisión lumínica en PPP fue el 100% de la tasa de agregación plaquetaria y la transmisión lumínica en PRP fue 0% de la tasa de agregación plaquetaria.

(b) Determinación de la concentración de colágeno y medición de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria.

En primer lugar, una cubeta de agregación en la que 200  $\mu$ L de la muestra de medición de PRP que no contenía SY-001 se había añadido, se dispuso en el agregómetro plaquetario, incubándose durante 2 minutos a 37°C. A continuación, 22,2  $\mu$ L de una solución de colágeno (proporcionada por NYCOMED GmbH, Moriya Sangyo), se añadió, midiéndose continuamente la tasa de agregación plaquetaria durante 5 minutos a 37°C. La tasa más alta de agregación plaquetaria en 5 minutos se convirtió en la tasa máxima de agregación plaquetaria. En la solución de colágeno, las concentraciones entre 5 y 20  $\mu$ g/mL (concentraciones finales en la muestra de medición de PRP fueron de 0,5 a 2  $\mu$ g/mL), se utilizaron como concentraciones submáximas en las que se indujo un 70% de la agregación plaquetaria máxima.

(c) Entonces, (i) SY-001 (22-269) (presentando la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 7 preparada en el Ejemplo 1, 3-(1) preparada a 30 nM, 100 nM y 300 nM, respectivamente, (ii) SY-001 (148-269) (teniendo la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 8 preparada en el Ejemplo 1, 3-(2) preparada a 100 nM, 300 nM y 1.000 nM, respectivamente o (iii) PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM LCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) como control, se añadió a cada recipiente en el cual 200  $\mu$ L de la muestra de medición de PRP, se había añadido. Cada mezcla se dispuso en el agregómetro plaquetario, inculcándose durante 2 minutos a 37°C. A continuación, 22,2  $\mu$ L de la solución de colágeno a una concentración dada determinada anteriormente, se añadió entonces, midiéndose durante 5 minutos la tasa de agregación plaquetaria, a partir de su adición.

El resultado de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001 (22-269) inducida por la estimulación con colágeno, se muestra en la figura 1. El resultado de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001 (148-269) inducida por la estimulación con colágeno, se muestra también en la figura 2

5 En cada figura, un eje horizontal representa un tiempo de entre (-0,5 a 5 minutos) a partir de 30 segundos antes de añadir el colágeno, y un eje vertical representa la tasa de agregación plaquetaria (%).

10 En la figura 1, la curva 1 representa el resultado en el caso de añadir SY-001 (22-269), a una concentración de 300 nM, la curva (2) muestra el resultado de SY-001 (22-269) a 100 nM, la curva 3 muestra el resultado de SY-001 (22-269) a 30 nM, y la curva 4 muestra el resultado del control.

15 En la figura 2, la curva 1 muestra el resultado en el caso de añadir SY-001 (148-269), a una concentración de 1.000 nM, la curva (2) muestra el resultado de SY-001 (148-269) a 300 nM, la curva (3) muestra el resultado de SY-001 (148-269) a 100 nM, y la curva (4) muestra el resultado del control.

Como se aprecia a partir de los resultados que se muestran en estas figuras, se ha descubierto que SY-001 de esta invención reduce la agregación plaquetaria inducida por la estimulación con colágeno, pues su cantidad añadida aumenta, es decir, SY-001 posee la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria.

20 Idénticos experimentos que los anteriores, se llevaron a cabo utilizando la proteína recombinante SY-001 (21-269) producida en el sistema de expresión baculovírico en el Ejemplo 2. Como resultado, presenta sustancialmente los mismos resultados obtenidos que los representados en la figura 1. En consecuencia puede apreciarse que el SY-001 de la presente invención, presenta una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria.

25 En los experimentos que utilizan el SY-001 (21-269) anterior, las tasas de agregación se obtuvieron cambiando las concentraciones de SY-001 (21-269) desde 3 nM a 1.000 nM. Entonces, el análisis log-logit para la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria ( $IC_{50}$ ) de SY-001 (21-269) se llevó a cabo utilizando software (SAS Institute, Japan, Release 8.1). Como resultado,  $IC_{50}$  de SY-001 (21-269), se calculó que era de 25 nM.

30 A partir de los resultados, se ha especulado que una porción epitópica presente en el lado C terminal entre las posiciones 148 y 269 en la secuencia de aminoácidos de SY-001 de SEC ID nº: 5, podría contribuir a la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de SY-001 de la presente invención.

#### 35 Ejemplo 4

Síntesis del mutante SY-001

El SY-001 se sintetiza bajo el procedimiento de síntesis en fase sólida, utilizando Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo).

40 Un polipéptido sintético con el número de residuos aminoácidos deseados, desde el extremo N al extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5 puede obtenerse reaccionando en un modo de flujo continuo TBTU.

[2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato] y HOBt [1-hidroxibenzotriazol hidrato] como reactivos activos.

45 Si es necesario el polipéptido sintético resultante puede disolverse en dimetilsulfóxido y diluirse posteriormente con acetonitrilo.

#### 50 Ejemplo 1 de formulación

(1) La composición farmacéutica de la presente invención en formulación inyectable, se preparó añadiendo y mezclando 100 µg/mL de SY-001 (con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8), 0,01 mg/mL de Tween 80. (Monooleato polioxietilénico (20) de sorbitan: Polisorbato 80), 15 mg/mL de dextrano 40, 0,1 mg/mL de cisteína y 1,0 mg/mL de HSA (albúmina sérica humana), en tampón 0,01 M de ácido cítrico-citrato sódico (pH 6,0), filtrando la mezcla (utilizando un filtro de membrana de 0,22 µm), distribuyendo entonces estérilmente el filtrado mediante 1 mL en un vial, y liofilizándolo. La formulación puede utilizarse disolviendo en 1 mL de solución salina que se esté utilizando.

60 (2) La composición farmacéutica de la presente invención en la formulación inyectable se preparó añadiendo 10 µg (0,1 mL) de SY-001 (con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8, 5 mg de ácido cítrico y 1 mg de albúmina sérica humana (HSA), por vial, en agua destilada para inyectable, llenando la solución resultante en un vial con 1 mL y liofilizándola.

Acción de AAPP sobre la adhesión plaquetaria al colágeno

65

Una solución SY-001 (50 µL), a 3, 10, 30, 100, 300, 1.000 o 3.000 nM, se añadió a una placa de 96 pocillos revestidos con 40 µg/mL de colágeno (NYCOMED GmbH), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, 50 µL de una suspensión plaquetaria ( $6 \times 10^8$ /mL células) se añadieron a cada pocillo, incubándose durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la solución en cada pocillo se eliminó utilizando una pipeta, lavándose los pocillos con 200 µL de PBS. A continuación 20 µL de PBS que contenían SDS al 1%, se añadieron a cada pocillo, que se agitó entonces sacudiendo y secándose al aire a 45°C. Entonces, 5 µL de agua destilada se añadieron a cada pocillo, midiéndose una concentración proteica en el pocillo, utilizando el kit del ensayo de la proteína Dc (BIO-RAD).

Los resultados se representan en la figura 3

Tal como se muestra en la figura 3, se identificó que SY-001 de la presente invención, inhibía la adhesión plaquetaria al colágeno de forma dosis-dependiente, y que SY-001 mostraba la potente acción inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria, particularmente a dosis de 300 µg (mL) o superiores.

Capacidad de unión de SY-001 al colágeno

Una solución bloqueante (300 µL) se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (NUNC, 152038), revestidos con colágeno, o una placa de 96 pocillos (NUNC 260895) no revestidos, incubándose durante una hora a temperatura ambiente. La solución en cada pocillo se eliminó, y 100 µL de una solución proteica de SY-001 a 3, 10, 30, 100 o 300, se añadió a cada pocillo, incubándose durante una hora a temperatura ambiente. La solución en cada pocillo se eliminó, añadiendo a cada uno de estos 200 µL de sacarosa al 2%, e incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución en cada pocillo se eliminó, secando el pocillo. A continuación, 100 µL de una solución Ni-HRP reconstituida (Detector urgente de Níquel-HRP proporcionado por KPL), se añadió a cada pocillo, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con un tampón, 100 µL de Sustrato Peroxidásico ABTS se añadió a cada pocillo, mezclándose suavemente con agitación. Después de finalizar la reacción, 100 µL de SDS al 1% se añadieron, midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de entre 405 a 410 nm, utilizando un lector de microplaca.

Los resultados se representan en la figura 4. Los triángulos representan una curva de reacción del vector vacío como control. Tal como se representa en la figura 4, se identificó que SY-001 poseía la capacidad de unión al colágeno.

Como anteriormente, pudo identificarse que el SY-001 de la presente invención no sólo tuvo acción inhibitoria sobre la agregación plaquetaria, sino que también acción inhibitoria plaquetaria sobre la adhesión al colágeno. También se pudo identificar que el SY-001 de la presente invención, poseía la capacidad de unión al colágeno.

A partir de estos resultados, la composición farmacéutica que incluye SY-001 de la presente invención como el componente activo, puede ser la composición farmacéutica útil como el agente terapéutico y los agentes preventivos para infarto miocárdico, embolismo pulmonar, infarto cerebral y similares.

Acción inhibitoria de la adhesión plaquetaria y capacidad de unión al colágeno del AAPP recombinante.

Figura 3: AAPP inhibe la adhesión plaquetaria al colágeno.

Figura 4: AAPP posee la capacidad al colágeno.

Texto del listado de secuenciación libre.

SEC ID nº: 10 representa la secuencia del cebador promotor SP6 representa la secuencia del cebador finalizador T7  
SEC ID nº: 11 representa la secuencia del cebador SEC ID nº: 12, pAnS-1 representa la secuencia cebador SEC ID nº: 13, pAnSG-F7 representa la secuencia cebador SEC ID nº: 14 representa la pAnSG.R1 primera secuencia, SEC ID nº: 15 representa la pAnSG-F8 primera secuencia y SEC ID nº: 16 representa la pAnSG-F10 primera secuencia.

### Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, es posible proporcionar la composición farmacéutica que contiene SY-001 o el polipéptido de la presente invención como componente activo. Se cree que la composición de la presente invención es útil como agente terapéutico o agente preventivo para estados patológicos subsiguientes a varias enfermedades, por ejemplo, las enfermedades y complicaciones causadas por trombos o émbolos, por ejemplo, síndrome coronario agudo, infarto miocárdico, embolismo cerebral, obstrucción arterial crónica, esclerosis arterial, infarto cerebral isquémico, angina, trombosis venosa, hipertensión, hipertensión pulmonar, infarto cerebral, infarto pulmonar, insuficiencia cardiaca, nefritis, insuficiencia renal y hemorragia subaracnoidea en los que SY-001 y el polinucleótido (molécula de ADN) que codifica el polipéptido SY-001 están implicados.

Además, se cree que la composición de la presente invención es útil para la prevención de la formación de trombos después de situar PTCA y la endoprótesis vascular y para la prevención de la reestenosis después de situar la endoprótesis vascular mediante plegamiento de SY-001 o aplicándola SY-001 o integrándola en la endoprótesis misma.

5 Utilizando SY-001 y la molécula de ADN que codifica SY-001 proporcionada por la presente invención, es posible cribar el agonista para el polipéptido o el producto expresado por la molécula de ADN (polipéptido de esta invención), es decir, cribar la sustancia que presenta la actividad para facilitar la actividad inhibitoria inherente para estas proteínas sobre la agregación plaquetaria y/o la adhesión plaquetaria como compuesto candidato.

10 **Listado de secuencias**

<110> Educational Foundation Jichi Medical University; Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Composición inhibidora de la agregación plaquetaria

15 <130> P06-117

<150> JP 2005-320817

<151> 2005/11/04

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1

<211> 248

<212> PRT

<213> Anopheles stephensi

<400> 1

Ser Asp Glu Thr Thr Asp Gln Glu Ser Ser Thr Glu Leu Ser Glu Asp  
1 5 10 15

Thr Ser Asp Ser Tyr His Gln Glu Glu Asp Thr Ser Glu Thr Gly Ala  
20 25 30

Asp Ala Gly Thr Glu Asp Gly Asn Ser Glu Asp Asp Ser Ser Glu Leu  
35 40 45

Glu Ser Ser Ser Glu Glu Gly His Glu Asp Gly Ser Glu Asp Ala Thr  
50 55 60

Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Glu Glu Asp  
65 70 75 80

Glu Ala Gly Glu Glu Gly Glu Ala Gly Glu Glu Gly Glu Ala Gly Glu  
85 90 95

25

ES 2 547 404 T3

Glu Gly Gly Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala  
 100 105 110

Asp Glu Glu Gly Ser Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Glu Gly Gly Glu  
 115 120 125

Glu Ser Pro Val Asn Thr Tyr His Gln Val His Asn Leu Leu Lys Asn  
 130 135 140

Ile Met Asn Val Gly Thr Lys Asn Asn Tyr Leu Lys Ser Phe Ile Leu  
 145 150 155 160

Ala Arg Leu Gln Glu Arg Leu Met Asn Pro Thr Ile Asp Leu Val Gly  
 165 170 175

Ser Ile Ser Lys Tyr Ser Lys Ile Lys Glu Cys Phe Asp Ser Leu Ala  
 180 185 190

Asp Asp Val Lys Ser Leu Val Glu Lys Ser Glu Thr Ser Tyr Glu Glu  
 195 200 205

Cys Ser Lys Asp Lys Asn Asn Pro His Cys Gly Ser Glu Gly Thr Arg  
 210 215 220

Glu Leu Asp Glu Gly Leu Ile Glu Arg Glu Gln Lys Leu Ser Asp Cys  
 225 230 235 240

Ile Val Glu Lys Arg Asp Ser Glu  
 245

- <210> 2
- <211> 744
- 5 <212> ADN
- <213> Anopheles stephensi

ES 2 547 404 T3

<400> 2  
 tccgacgaga ctacggatca agaatcatcg accgagctaa gcgaagacac ttcggatagc 60  
 taccaccagg aagaggatac atcagaaacc ggtgccgatg ctggtacaga ggacggtaat 120  
 tcggaagatg actccagcga attagaatct tcttcggaag aaggtcatga ggatggtagc 180  
 gaagacgcta ctggtgagga aggtggggca ggcgagaaag gtgaggccgg tgaggaagac 240  
 gaggcaggcg aggaaggta ggcaggtag gaaggtaag caggtaaga aggtggtgca 300  
 ggtgaagaag ggggagcagg tgaagaaggc ggtgcagacg aagaaggtag tgcaggtaa 360  
 gaaggcggg cagaaggagg tgaagagtc cccgttaata cctaccatca ggtgcacaac 420  
 ttgctgaaga acatcatgaa cgttggcagc aagaacaatt acttgaagtc gttcatttg 480  
 gccgcctgc aggaacgtct catgaacccc acgatcgacc tggtcggcag tatctccaaa 540  
 tattccaaga ttaaggaatg ctccractcg ctrgccgacg atgtgaaatc tctggtggag 600  
 aagtccgaaa catcgtaga agagtgcagc aaggacaaga ataacctca ctgaggcagt 660  
 gaaggtacac gcgagcttga cgagggactc atcgaacggg aacagaagct atcggattgc 720  
 atcgtcgaaa agcgtgattc agag 744

<210> 3  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Anopheles stephensi

5

<400> 3  
 Gly Glu Glu Ser Pro Val Asn Thr Tyr His Gln Val His Asn Leu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Asn Ile Met Asn Val Gly Thr Lys Asn Asn Tyr Leu Lys Ser Phe  
 20                   25                   30  
 Ile Leu Ala Arg Leu Gln Glu Arg Leu Met Asn Pro Thr Ile Asp Leu



ES 2 547 404 T3

<400> 5

Met Lys Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Val Leu Cys Leu Ala Leu Ile  
 1 5 10 15

Val Ser Ala Arg Pro Ser Asp Glu Thr Thr Asp Gln Glu Ser Ser Thr  
 20 25 30

Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asp Ser Tyr His Gln Glu Glu Asp Thr  
 35 40 45

Ser Glu Thr Gly Ala Asp Ala Gly Thr Glu Asp Gly Asn Ser Glu Asp  
 50 55 60

Asp Ser Ser Glu Leu Glu Ser Ser Ser Glu Glu Gly His Glu Asp Gly  
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Ala Thr Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Lys Gly Glu  
 85 90 95

Ala Gly Glu Glu Asp Glu Ala Gly Glu Glu Gly Glu Ala Gly Glu Glu  
 100 105 110

Gly Glu Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly  
 115 120 125

Glu Glu Gly Gly Ala Asp Glu Glu Gly Ser Ala Gly Glu Glu Gly Gly  
 130 135 140

Ala Glu Gly Gly Glu Glu Ser Pro Val Asn Thr Tyr His Gln Val His  
 145 150 155 160

Asn Leu Leu Lys Asn Ile Met Asn Val Gly Thr Lys Asn Asn Tyr Leu

ES 2 547 404 T3

	165		170		175	
Lys Ser Phe Ile Leu Ala Arg Leu Gln Glu Arg Leu Met Asn Pro Thr						
	180		185		190	
Ile Asp Leu Val Gly Ser Ile Ser Lys Tyr Ser Lys Ile Lys Glu Cys						
	195		200		205	
Phe Asp Ser Leu Ala Asp Asp Val Lys Ser Leu Val Glu Lys Ser Glu						
	210		215		220	
Thr Ser Tyr Glu Glu Cys Ser Lys Asp Lys Asn Asn Pro His Cys Gly						
	225		230		235	240
Ser Glu Gly Thr Arg Glu Leu Asp Glu Gly Leu Ile Glu Arg Glu Gln						
	245		250		255	
Lys Leu Ser Asp Cys Ile Val Glu Lys Arg Asp Ser Glu						
	260		265			

<210> 6  
 <211> 807  
 <212> ADN  
 <213> Anopheles stephensi

5

<400> 6

atgaagcttc tactcctact agccagcgtg cttgccttg cgctgatcgt atccgcacgg	60
ccgtccgacg agactacgga tcaagaatca tcgaccgagc taagcgaaga cacttcggat	120
agctaccacc aggaagagga tacatcagaa accggtgccg atgctggtac agaggacggt	180
aattcggag atgactccag cgaattagaa tcttcttcgg aagaagtca tgaggatggt	240
agcgaagacg ctactggtga ggaaggtggg gcaggcgaga aaggtgagcc cggtaggaa	300
gacgaggcag gcgaggaagg tgaggcaggt gaggaaggtg aagcaggtga agaaggtggt	360

ES 2 547 404 T3

gcaggtgaag aaggcggagc aggtgaagaa ggcggtgcag acgaagaagg tagtgcaggt 420  
 gaagaaggcg gtgcagaagg tggtaagag tccccgtta atacctacca tcaggtgcac 480  
 aacttgctga agaacatcat gaacgttggc acgaagaaca attactttaa gtcgttcatt 540  
 ttggcccgcc tgcaggaacg tctcatgaac cccacgatcg acctggtcgg cagtatctcc 600  
 aatattcca agattaagga atgccttcgac tcgctggccg acgatgtgaa atctctggtg 660  
 gagaagtccg aaacatcgta cgaagagtgc agcaaggaca agaataaccc tcaactgcggc 720  
 agtgaaggta cacgcgagct tgacgagga ctcatcgaac gggaacagaa gctatcggat 780  
 tgcctcgtcg aaaagcgtga ttcagag 807

<210> 7

<211> 420

5 <212> PRT

<213> Anopheles stephensi

<400> 7

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

```

      115              120              125
Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 130              135              140
His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met
 145              150              155              160
Ala Ser Asp Glu Thr Thr Asp Gln Glu Ser Ser Thr Glu Leu Ser Glu
      165              170              175
Asp Thr Ser Asp Ser Tyr His Gln Glu Glu Asp Thr Ser Glu Thr Gly
      180              185              190
Ala Asp Ala Gly Thr Glu Asp Gly Asn Ser Glu Asp Asp Ser Ser Glu
      195              200              205
Leu Glu Ser Ser Ser Glu Glu Gly His Glu Asp Gly Ser Glu Asp Ala
      210              215              220
Thr Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Glu Glu
 225              230              235              240
Asp Glu Ala Gly Glu Glu Gly Glu Ala Gly Glu Glu Gly Glu Ala Gly
      245              250              255
Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Glu Gly Gly
      260              265              270
Ala Asp Glu Glu Gly Ser Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Glu Gly Gly
      275              280              285
Glu Glu Ser Pro Val Asn Thr Tyr His Gln Val His Asn Leu Leu Lys
      290              290              300
Asn Ile Met Asn Val Gly Thr Lys Asn Asn Tyr Leu Lys Ser Phe Ile
 305              310              315              320
Leu Ala Arg Leu Gln Glu Arg Leu Met Asn Pro Thr Ile Asp Leu Val
      325              330              335
Gly Ser Ile Ser Lys Tyr Ser Lys Ile Lys Glu Cys Phe Asp Ser Leu
      340              345              350
Ala Asp Asp Val Lys Ser Leu Val Glu Lys Ser Glu Thr Ser Tyr Glu
      355              360              365

Glu Cys Ser Lys Asp Lys Asn Asn Pro His Cys Gly Ser Glu Gly Thr
      370              375              380
Arg Glu Leu Asp Glu Gly Leu Ile Glu Arg Glu Gln Lys Leu Ser Asp
 385              390              395              400
Cys Ile Val Glu Lys Arg Asp Ser Glu Ala Ala Ala Leu Glu His His
      405              410              415

His His His His
      420

```

- <210> 8
- 5 <211> 293
- <212> PRT
- <213> Anopheles stephensi

<400> 8

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp  
 1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp  
 20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp  
 35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn  
 50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu  
 65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser  
 85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly  
 100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln  
 130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met  
 145 150 155 160

Gly Glu Glu Ser Pro Val Asn Thr Tyr His Gln Val His Asn Leu Leu  
 165 170 175

Lys Asn Ile Met Asn Val Gly Thr Lys Asn Asn Tyr Leu Lys Ser Phe  
 180 185 190

Ile Leu Ala Arg Leu Gln Glu Arg Leu Met Asn Pro Thr Ile Asp Leu  
 195 200 205

Val Gly Ser Ile Ser Lys Tyr Ser Lys Ile Lys Glu Cys Phe Asp Ser  
 210 215 220

Leu Ala Asp Asp Val Lys Ser Leu Val Glu Lys Ser Glu Thr Ser Tyr  
 225 230 235 240

Glu Glu Cys Ser Lys Asp Lys Asn Asn Pro His Cys Gly Ser Glu Gly  
 245 250 255

Thr Arg Glu Leu Asp Glu Gly Leu Ile Glu Arg Glu Gln Lys Leu Ser  
 260 265 270

Asp Cys Ile Val Glu Lys Arg Asp Ser Glu Ala Ala Ala Leu Glu His  
 275 280 285

His His His His His  
 290

- 5 <210> 9
- <211> 270
- <212> PRT
- <213> Anopheles stephensi

<400> 9

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Ser Pro Ser Asp Glu Thr Thr  
 1 5 10 15

Asp Gln Glu Ser Ser Thr Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asp Ser Tyr  
 20 25 30

His Gln Glu Glu Asp Thr Ser Glu Thr Gly Ala Asp Ala Gly Thr Glu  
 35 40 45

Asp Gly Asn Ser Glu Asp Asp Ser Ser Glu Leu Glu Ser Ser Ser Glu  
 50 55 60

Glu Gly His Glu Asp Gly Ser Glu Asp Ala Thr Gly Glu Glu Gly Gly  
 65 70 75 80

Ala Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Glu Glu Asp Glu Ala Gly Glu Glu  
 85 90 95

Gly Glu Ala Gly Glu Glu Gly Glu Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly  
 100 105 110

Glu Glu Gly Gly Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Asp Glu Glu Gly Ser  
 115 120 125

Ala Gly Glu Glu Gly Gly Ala Glu Gly Gly Glu Glu Ser Pro Val Asn  
 130 135 140

Thr Tyr His Gln Val His Asn Leu Leu Lys Asn Ile Met Asn Val Gly  
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Asn Tyr Leu Lys Ser Phe Ile Leu Ala Arg Leu Gln Glu  
 165 170 175

Arg Leu Met Asn Pro Thr Ile Asp Leu Val Gly Ser Ile Ser Lys Tyr  
 180 185 190

Ser Lys Ile Lys Glu Cys Phe Asp Ser Leu Ala Asp Asp Val Lys Ser  
 195 200 205

Leu Val Glu Lys Ser Glu Thr Ser Tyr Glu Glu Cys Ser Lys Asp Lys  
 210 215 220

Asn Asn Pro His Cys Gly Ser Glu Gly Thr Arg Glu Leu Asp Glu Gly  
 225 230 235 240

Leu Ile Glu Arg Glu Gln Lys Leu Ser Asp Cys Ile Val Glu Lys Arg  
 245 250 255

Asp Ser Glu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His  
 260 265 270

- 5 <210> 10
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> cebador de promotor SP6

<400> 10  
 gatttagtg acactatag 19

<210> 11  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de finalizador T7

5 <400> 11  
 taatagcact cactataggg 20

<210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador pAnS-1

<400> 12  
 cttagggggc aattatggat ggta 24

15 <210> 13  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> pAnSG-F7

<400> 13  
 caccatggcg tccgacgaga ctacggatca agaa 34

25 <210> 14  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> pAnSG-R1

30 <400> 14  
 ggcggccgcc tctgaatcac gctttcgac gatgc 35

<210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> pAnSG-F8

<400> 15  
 caccatgggt gaagagtccc ccgtaatac 30

40 <210> 16  
 <211> 74  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> pAnSG-F10

# ES 2 547 404 T3

<400> 16

caccggaicc ggactacaag gacgacgatg acaagatcl. accgtccgac gagactacgg 60

atcaagaalc atcg 74

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para su utilización como un medicamento que comprende por lo menos un polipéptido de los (a) a (b) siguientes como un componente activo:
- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3; y
- 10 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de 70% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos del (a) anterior y que presenta una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.
- 15 2. Composición farmacéutica para su utilización como un medicamento que comprende un polipéptido, que es expresado mediante por lo menos un polinucleótido de los (c) a (e) siguientes como un componente activo:
- (c) un polinucleótido que comprende la secuencia de ADN de SEC ID nº: 4, o su complemento;
- (d) un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido del (c) anterior bajo unas condiciones rigurosas y puede expresar un polipéptido que presenta una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria; y
- 20 (e) un polinucleótido que comprende la secuencia de ADN que presenta una homología de 80% o superior respecto al polinucleótido del (c) anterior y que puede expresar **un** polipéptido que presenta una actividad inhibitoria agregatoria plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.
- 25 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria es la actividad inhibitoria a la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y/o la actividad inhibitoria sobre la adhesión plaquetaria al colágeno.
- 30 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha composición farmacéutica presenta la capacidad de unión al colágeno.
- 35 5. Inhibidor de la agregación plaquetaria y/o inhibidor de la adhesión plaquetaria, que comprende el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o el polipéptido, que es expresado mediante el polinucleótido descrito en la reivindicación 2, para su utilización como un medicamento.
- 40 6. Composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento o la prevención de un estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo que comprende por lo menos un polipéptido de los (a) a (b) siguientes como un componente activo:
- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3; y
- (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de 70% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos del (a) anterior y que presenta una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.
- 45 7. Composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento o la prevención de un estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo que comprende un polipéptido, que es expresado mediante por lo menos un polinucleótido de los (c) a (e) siguientes como un componente activo:
- 50 (c) un polipéptido que comprende la secuencia de ADN de SEC ID nº: 4, o de su complemento;
- (d) un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido del (c) anterior bajo condiciones rigurosas y puede expresar un polipéptido que presenta una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria; y
- 55 (e) un polinucleótido que comprende la secuencia de ADN que presenta una homología de 80% o superior respecto al polinucleótido del (c) anterior, y puede expresar **un** polipéptido que presenta una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria.
- 60 8. Procedimiento para el cribado de un agonista para una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria, en el que un nivel de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria del polipéptido descrito en la reivindicación 1 se mide en presencia o ausencia de una sustancia objeto y un valor de medición en presencia de la sustancia objeto se compara con **el** valor de medición en ausencia de la sustancia objeto para seleccionar la sustancia objeto que aumenta la acción inhibitoria como el agonista.
- 65

- 5 9. Procedimiento para el cribado de un agonista para una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria, en el que un nivel de la actividad inhibitoria del polipéptido, que es expresado por el polinucleótido descrito en la reivindicación 2, se mide en presencia o ausencia de una sustancia objeto y un valor de medición en presencia de la sustancia objeto se compara con un valor de medición en ausencia de la sustancia objeto para seleccionar la sustancia objeto que aumenta la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria como el agonista.
- 10 10. Procedimiento para el cribado de una sustancia candidata que facilita una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y/o una actividad inhibitoria de la adhesión plaquetaria del polipéptido descrito en la reivindicación 1 o el polipéptido descrito en la reivindicación 2 que comprende las etapas (1) a (4) siguientes:
- 15 (1) una etapa de preparación de un medio de cultivo que comprende una célula transformada con un vector de expresión, que expresa el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o una célula que comprende el polipéptido, que se expresa por el polinucleótido descrito en la reivindicación 2 y plasma rico en plaquetas;
- (2) una etapa de adición de un agente de agregación plaquetaria en el medio de cultivo del (1) anterior, para inducir la agregación plaquetaria en presencia o ausencia de una sustancia objeto;
- 20 (3) una etapa de medición de un nivel de la agregación plaquetaria en presencia o ausencia de la sustancia objeto en el (2) anterior; y
- (4) una etapa de selección de la sustancia objeto como sustancia candidata cuando un valor de medición en presencia de la sustancia objeto es superior a un valor de medición en ausencia de la sustancia objeto.
- 25 11. Kit para el cribado de un agonista para el polipéptido descrito en la reivindicación 1 o el polipéptido expresado por el polinucleótido descrito en la reivindicación 2, caracterizado por que contiene como componentes plasma rico en plaquetas, uno del polipéptido descrito en la reivindicación 1 y el polipéptido descrito en la reivindicación 2, y un agente agregante plaquetario.
- 30 12. Polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº: 3 o 5, para la utilización en terapia.
- 35 13. Polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº: 3 o 5 para la utilización en el tratamiento o la prevención de un estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo.
- 40 14. Utilización de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº: 3 o 5, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una estado patológico causado por la formación de un trombo o émbolo.
15. Polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3.
16. Polinucleótido que consiste en la secuencia de ADN de SEC ID nº: 4 o su complemento.

Fig.1

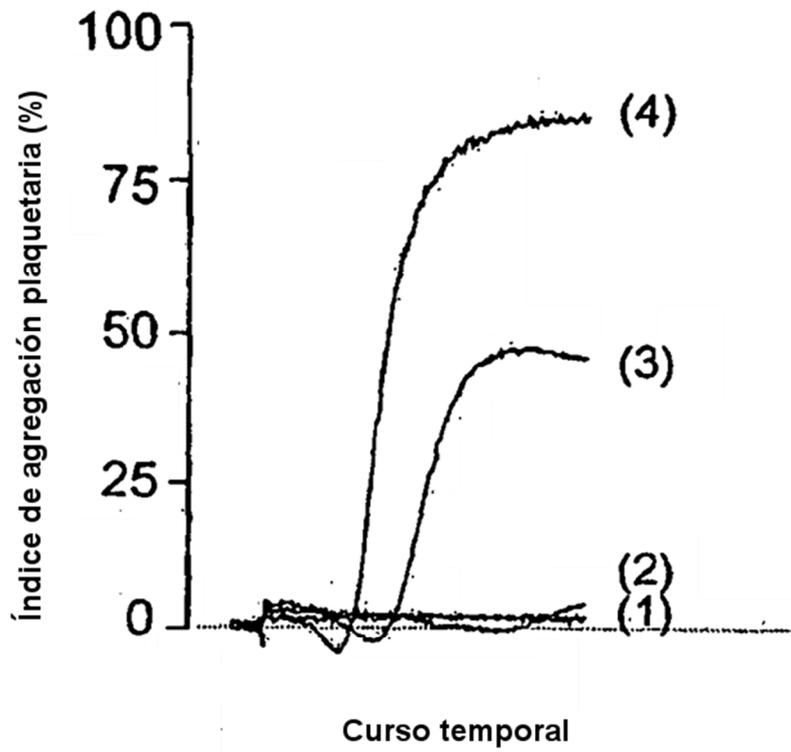


Fig.2

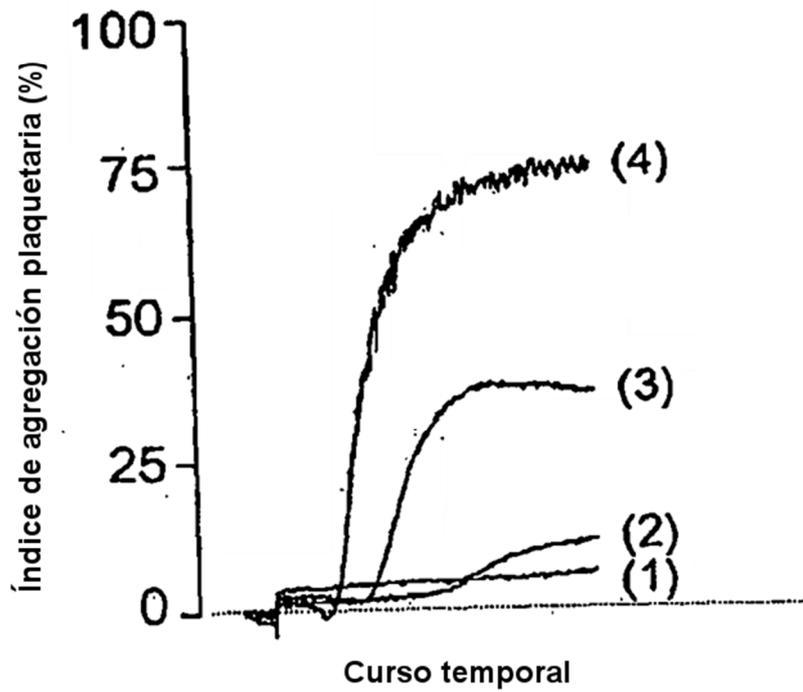


Fig.3

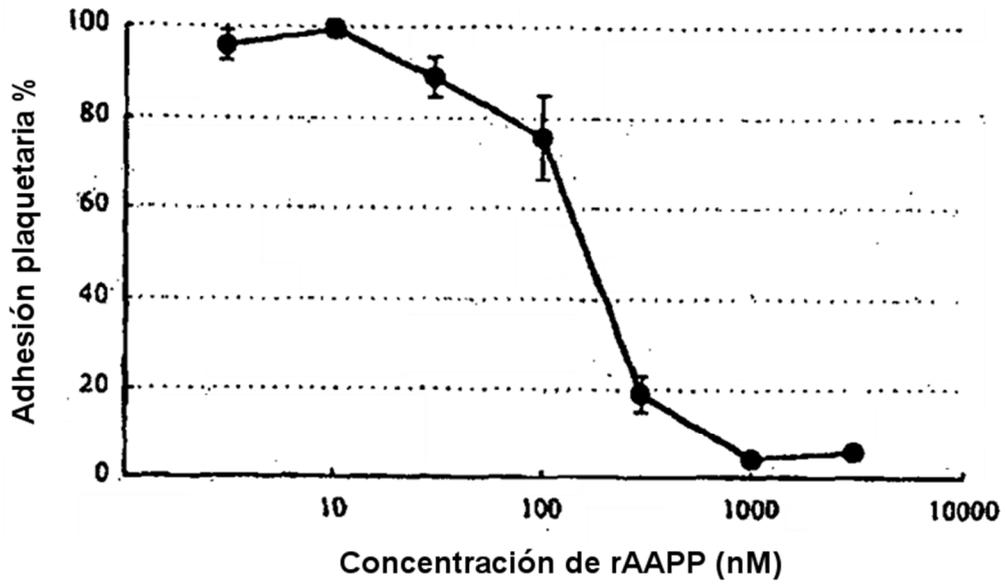


Fig.4

