



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1668721 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 14

(21) 申请号 03817279. 8

A61P 7/02(2006. 01)

(22) 申请日 2003. 06. 05

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

7, 8.

02012742. 9 2002. 06. 07 EP

WO 0100810 A1, 2001. 01. 04, 说明书第 41 页第 18 行— 44 页第 8 行.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

NIESWANDT BERNHARD 等. Glycoprotein VI

2005. 01. 19

but not alpha2beta1 integrin is essential

(86) PCT 申请的申请数据

for platelet interaction with collagen. EMBO

PCT/EP2003/005929 2003. 06. 05

JOURNAL20 9. 2001, 20(9), 全文.

(87) PCT 申请的公布数据

审查员 贾涛

W02003/104282 EN 2003. 12. 18

(73) 专利权人 克利姆恩有限公司

地址 德国马丁斯里德

(72) 发明人 S·玛斯彼尔格 M·伽瓦兹

A·布尔特曼 G·曼驰 M·安格尔

M·佩鲁索

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 31 页

序列表 9 页 附图 27 页

(54) 发明名称

含有糖蛋白 VI 结构域的免疫粘附素

(57) 摘要

本发明提供一种融合蛋白,它包括:(a) 糖蛋白 VI 细胞外结构域或其具有胶原蛋白结合功能的变体,和 (b) 免疫球蛋白的 Fc 结构域或其功能保守性部分。该融合蛋白的特征在于附图 7 所示的氨基酸序列,而且该融合蛋白可获自一种以特异二聚体形式提供该融合蛋白的方法。

1. 一种融合蛋白,包含:

- a) GPVI 的胞外结构域;和
- b) 免疫球蛋白的 Fc 结构域,

其中所述胞外结构域和 Fc 结构域通过氨基酸序列为 Gly-Gly-Arg 的连接体而融合,且其中所述的融合蛋白是同二聚体融合蛋白。

2. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述 Fc 结构域是 IgG Fc 结构域。

3. 权利要求 1 或 2 的融合蛋白,其中每一单体的特征在于图 7 的氨基酸序列。

4. 权利要求 1 或 2 的融合蛋白,其中所述 GPVI 的胞外结构域是人类的。

5. 权利要求 1 或 2 的融合蛋白,其中所述 Fc 结构域是人类的。

6. 权利要求 1 的融合蛋白,其中两个单体是共价连接的。

7. 一种核酸序列,其含有选自下列的序列:

a) SEQ ID No :2 的核酸或其按照遗传密码的简并性编码相同多肽的变体;

b) 编码至少 300 个氨基酸的多肽的核酸,其中具有至少 100 个氨基酸的片段其功能是结合胶原蛋白,具有至少 200 个氨基酸的片段其功能是作为 Fc 结构域,其特征不在于 SEQ ID No :2 的序列。

8. 权利要求 7 的核酸,其中相应于 SEQ ID No :2 的第 1 至 807 位的碱基编码 GPVI 的胞外结构域。

9. 权利要求 7 的核酸,其中相应于 SEQ ID No :2 的第 817 至 1515 位的碱基编码 IgG 免疫球蛋白的 Fc 结构域。

10. 权利要求 7-9 任一项的核酸编码的蛋白。

11. 含有权利要求 7-9 任一项的核酸的载体。

12. 细胞,其表达权利要求 1-6 任一项的融合蛋白。

13. 含有免疫粘附素的药物组合物,所述免疫粘附素含有 GPVI 的胞外结构域,以及免疫球蛋白的 Fc 结构域,其中所述胞外结构域和 Fc 结构域通过具有 Gly-Gly-Arg 氨基酸序列的连接体连接,且其中所述的融合蛋白是同二聚体融合蛋白。

14. 权利要求 13 的药物组合物,其是静脉内施用的制剂。

15. 权利要求 1-6 中任一项的融合蛋白在制备药物中的应用,其中所述药物用于治疗或预防患者中的动脉粥样硬化。

16. 权利要求 1-6 中任一项的融合蛋白在制备药物中的应用,其中所述药物用于预防患者中的动脉内血栓形成。

17. 权利要求 16 的应用,其中所述患者患有急性冠状动脉或颈动脉综合征,并具有活性动脉内损伤。

18. 权利要求 15-17 任一项的应用,其中所述药物用于口服、皮下施用、腹膜内施用或静脉内施用。

19. 权利要求 15-18 任一项的应用,其中所述药物用于治疗糖尿病的动脉粥样硬化并发症。

20. 权利要求 1-6 中任一项的融合蛋白在体外筛选抑制剂中的用途,其中所述抑制剂抑制 GPVI 与胶原蛋白的结合。

21. 权利要求 20 的应用,其中所述融合蛋白或同二聚体融合蛋白是荧光标记的。

22. 权利要求 1-6 中任一项的融合蛋白在筛选抑制剂中的用途,其中所述抑制剂抑制 GPVI 介导的血小板向活性血管内损伤的粘附。

## 含有糖蛋白 VI 结构域的免疫粘附素

[0001] 本发明涉及一种含有特定糖蛋白 VI 结构域的免疫粘附素。本发明的免疫粘附素可以通过以二聚体形式提供免疫粘附素的特定方法获得。本发明还涉及具有糖蛋白 VI 的免疫粘附素用于制备预防特定病人群体中动脉内血栓形成的药物的用途。此外,本发明还涉及具有糖蛋白 VI 的免疫粘附素用于制备预防和治疗动脉粥样硬化发展 (atheroprogession) 的药物的用途。本发明还涉及具有糖蛋白 VI 的免疫粘附素用于制备预防和治疗糖尿病患者动脉粥样硬化慢性发展的药物的用途。本发明还涉及由 GPVI 介导的血小板与活性血管内损伤粘附的抑制剂的体外和体内筛选方法。

[0002] 急性冠状动脉或颈动脉综合征是西方社会导致死亡的主要原因。即使是在从这样的心血管事件中首次存活下来,许多病人仍然患有象血管内血栓形成这样导致进一步心肌梗死或中风的危及生命的并发症。

[0003] 血管内血栓形成是血小板在血管内凝集的结果,血管内的血流由此可能被严重减弱或者甚至完全阻断。特别地,动脉粥样硬化斑块的破坏引发一串级联事件使动脉血栓形成和下游组织缺血达到高峰、导致象心肌梗死或缺血性中风这样的疾病。血管损伤的第一个反应是循环血小板粘附于暴露的内皮下基质蛋白质,这启动随后的血小板凝集。内皮下层的大分子成分中原纤维状胶原蛋白被视为最主要的血栓形成要素,因为它起着强血小板激活剂的作用并在体内和体外都支持血小板粘附 (1-3)。

[0004] 已被报道为推定的胶原蛋白受体的血小板膜蛋白可以分为:那些通过与胶原蛋白结合型 von Willebrand 因子 (vWf) 而与胶原蛋白间接互作的血小板膜蛋白,包括 GPIIb  $\alpha$  和整合蛋白  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , 和那些直接与胶原蛋白互作的血小板膜蛋白,包括 GPVI、整合蛋白  $\alpha_2\beta_1$ 、和 CD36 (综述于 (2))。只是在最近,血小板糖蛋白 VI (GPVI) 已经被鉴定为主要的血小板胶原蛋白受体 (4)。GPVI 是一个 60-65kDa 的 I 型跨膜糖蛋白 VI,它属于免疫球蛋白超家族 (5 ;6)。在人和小鼠血小板中 GPVI 与 FcR  $\gamma$  - 链在细胞表面形成复合物 (7 ;8)。与 GPVI 结合的配体启动 Fc 受体  $\gamma$  链 ITAM 基序的酪氨酸磷酸化从而引发经 Syk 激酶、LAT、SLP-76、和磷脂酶 C 的下游信号 (9-13)。GPVI 缺陷的血小板在体外表现出丧失由胶原蛋白诱导的粘附和凝集 (4 ;14)。同样,功能阻断型抗 GPVI 单克隆抗体会减弱由于对胶原蛋白或胶原蛋白相关蛋白 CRP 的应答而产生的离体血小板凝集,其中胶原蛋白相关肽 CRP 模拟了胶原蛋白的三螺旋 (15 ;16)。

[0005] 已知由血小板凝集而产生的并发症问题可以通过施用血小板凝集抑制剂来进行解决。对于治疗急性冠状动脉综合征,象 ReoPro 这样的 GP IIb/IIIa 抑制剂显著改善病人的情况。然而,最近的临床试验 meta- 分析揭示,尽管优化了抗血栓干涉但却存有显著的死亡或心肌梗死风险 (Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, TherouxP, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Plateletglycoprotein VI IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes :a meta-analysis of all major randomised clinical trials. Lancet2002 ;359 :189-98)。这种治疗方案的特别严重的副作用是出血并发症。它们以 2.4% 在患者中出现,并且最严重的颅内出血形式以 0.1% 出现于被治疗的患者中。已经

揭示了几种解释次优效果和副作用的关于 GP IIb/IIIa 受体阻断的机制缺陷 (Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res.* 2001 ;101 :53-64. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membraneglycoprotein VI in coronary artery disease :consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999 ;99 :E1-E11)。

[0006] 对血小板凝集的抑制导致对血小板凝集能力的总体损伤。相应地,不仅使不期望的血栓形成收到影响,还影响了血小板终止出血的一般能力。因此,施用血小板凝集抑制剂固有机会会导致象出血这样的可能进一步引起危及生命的并发症的严重副作用。这些副作用对于糖尿病患者当然更成问题。

[0007] 糖尿病是动脉粥样硬化的主要风险因子。因此糖尿病在表现急性血管特别是冠状动脉综合征的患者中构成了一种增长的危及生命的并发症、以及额外发病率的风险。伴有不稳定心绞痛的糖尿病患者比非糖尿病患者呈现更高的溃疡斑和冠状动脉内血栓形成发生率。(Biondo-Zoccai GGL ;Abbate A ;Liuzzo G, Biasucci L :Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. *J Am Coll Cardiol* 41 ;1071-1077 ;2003)。

[0008] 人们日益认识到血小板是动脉粥样硬化进展的主要开关。升高的动脉粥样硬化进展与升高的血小板应答及糖尿病之间的关联迄今仍是未解决的问题。糖尿病人患急性血管并发症不依赖于动脉粥样硬化的程度,这一程度预示糖尿病急性血管并发症和动脉粥样硬化急性血管并发症发展过程中血小板活化的几种不同的目前未知的机制。

[0009] 因此,本发明的问题是提供一种用于避免急性冠状动脉或颈动脉综合征后危及生命的并发症并保持血液止血潜能的药物。

[0010] 本发明进一步的问题是,提供一种用于治疗或预防动脉粥样硬化进展的药物。

[0011] 本发明进一步的问题还是提供一种用于治疗糖尿病、特别是糖尿病相关并发症的药物。

[0012] 本发明进一步的问题是提供一种体外和体内筛选血小板与血管内损伤粘附的抑制剂的方法。

[0013] 发明概述

[0014] 上述问题按照权利要求来解决。本发明提供第一项体内直接证据,该证据表明:在血管损伤后的生理剪切压力下 GPVI 实际上是血小板募集过程中严格必需的。在不同的内皮剥落小鼠模型中,GPVI 抑制或缺失都实质上废除了血小板-血管壁互作和血小板凝集,据此将 GPVI 鉴定为动脉血栓形成的主要决定因素。这预示着,对 GPVI-配体互作的抑制预防动脉粥样硬化过程中的动脉血栓形成。本发明利用 GPVI 的一种特异可溶形式的抗血栓形成潜力。更确切地,提供了一种融合蛋白,它含有 GPVI 细胞外结构域和人 N-末端 Fc 标签。人 GPVI 的这一可溶形式以高亲和力与胶原蛋白特异结合,使血小板在体外与固定的胶原蛋白、在体内与血管损伤位点的粘附减弱。因此,本发明是以以下认识为基础的:动脉内血栓形成成为急性临床并发症的前提条件是血小板与血管壁中活性损伤的初始粘附。本发明人已经认识到,血小板经糖蛋白 VI (GPVI) 受体在血管壁损伤处与内皮下基质胶原蛋白的粘附是血栓形成的关键事件。因此,本发明融合蛋白对血小板粘附于内皮下基质胶原蛋白的抑制不仅能防止血小板粘附于活性损伤,而且能防止血小板在活性损伤处凝集。因此,

可以有效地避免血管内血栓形成而不破坏血小板的一般凝集能力。

[0015] 令人惊讶的是,根据内皮下层不同成分是象层粘连蛋白、纤连蛋白、von Willebrand 因子(vWf)和胶原蛋白这样的血小板配体或激活剂这一事实,可以通过对单个血小板受体的抑制来抑制血栓形成这一复杂过程。此外,血小板上的大量受体已被体外考察鉴定,但是在体内影响血小板粘附于损伤的相关受体或受体组合在之前是未知的。

[0016] 本发明还基于这一认识:GPVI 是动脉粥样硬化发展过程中血小板活性的主要介导体(mediator)。已经证实,对由胶原蛋白介导的 GPVI 活化的抑制会削弱易患动脉粥样硬化的 Apo e<sup>-/-</sup>小鼠中的动脉粥样硬化进程(参见附图 16)。此外还证实,也倾向于患进行性动脉粥样硬化和增强的血栓形成并发症的糖尿病患者的血小板显示 GPVI-共受体 Fc-受体的表达增强。因此,糖尿病患者的血小板或许在由于斑块破裂或内皮脱落而暴露于内皮下血管层的胶原蛋白的地方显示出对胶原蛋白刺激的增强应答,从而导致临床观察到不稳定心绞痛中增强的血栓形成并发症。

[0017] 本发明因此提供对患者,尤其是糖尿病患者中动脉粥样硬化发展的治疗。此外,本发明提供治疗特别是糖尿病患者中象血管内血栓形成这样的急性血管并发症的药物。免疫粘附素 Fc-GPVI-nt 是一种减弱动脉粥样硬化进程以及减弱血小板经 GPVI 受体对胶原蛋白的增强应答的潜在治疗工具。因此,Fc-GPVI-nt 是一种用于治疗动脉粥样硬化且特别是治疗糖尿病动脉粥样硬化并发症的药物。

[0018] 该发明提供了一种含有下列片段的融合蛋白(Fc-GPVI-nt):(a)糖蛋白 VI(GPVI)细胞外结构域或其具有胶原蛋白结合功能的变体,和

[0019] (b)免疫球蛋白的 Fc 结构域或其功能保守性部分。

[0020] 该融合蛋白的特征在于附图 7 所示的氨基酸序列。根据本发明的融合蛋白获自或可以获自以下方法:

[0021] (a)感染后 2 天收集已用编码附图 7 所示氨基酸序列的 Fc-GPVI-nt 腺病毒感染的 HeLa 细胞培养物上清液;

[0022] (b)离心(3800g,30 分钟,4°C)步骤(a)的上清液;

[0023] (c)过滤(0.45 μm)步骤(b)的上清液;

[0024] (d)加入一倍体积的硫酸铵使免疫粘附素沉淀,并于 4°C 搅拌过夜;

[0025] (e)离心(3000g,30 分钟,4°C)使蛋白质成团,

[0026] (f)将步骤(e)中的成团蛋白质溶于 0.1 倍体积的 PBS,并在 PBS 中 4°C 透析过夜;

[0027] (g)离心(3000g,30 分钟,4°C)使蛋白质溶液澄清;

[0028] (h)将步骤(g)中的溶液上载至蛋白质 A 柱(HiTrap™ 蛋白质 AHP, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden);

[0029] (i)用结合缓冲液(20mM 磷酸钠缓冲液 pH7.0,0.02% NaN<sub>3</sub>)洗涤柱直至 OD<sub>280</sub> < 0.01;

[0030] (k)用洗脱缓冲液(100mM 甘氨酸 pH2.7)将级分洗脱;

[0031] (l)用中和缓冲液(1M Tris/HCl pH9.0,0.02% NaN<sub>3</sub>)中和洗脱的级分;

[0032] (m)合并级分;

[0033] (n)4°C 下将合并的级分在 PBS 中透析过夜,

[0034] (o)将透析产物等分并于 -20°C 冷冻。

[0035] 在上述条件下,融合蛋白以共价连接的二聚体形式获得,在非还原条件下用 SDS-PAGE 测定该二聚体的分子质量为 160kDa。推测通过与 GPVI 片段相邻的特定结构域中的链间半胱氨酸二硫键来形成融合蛋白的二聚化,GPVI 片段的氨基酸序列如附图 7 所示。融合蛋白的二聚体性质至少依赖在 Fc 部分和附图 7 所含的 GPVI 部分间的特定区域的存在以及制备方法。实践中将单体融合蛋白用作治疗性试剂是没有用的,因为为获得相似的效果,与二聚体融合蛋白相比的单体融合蛋白的内部结合特性要求其以比二聚体融合蛋白高出约一个数量级的量施用,参见附图 9(e)。然而,从治疗和经济角度考虑,施用大量蛋白质是有问题的,尤其是对于慢性疾病的治疗。

[0036] 本发明的融合蛋白是一种免疫粘附素。它具有一个片段 (a),该片段具有血小板 GPVI 细胞外结构域的功能。所述 GPVI 可以是哺乳动物 GPVI,优选为人 GPVI。所述功能优选为与 GPVI 配体胶原蛋白结合。GPVI 的整个细胞外结构域或其任何片段可用于所述的融合蛋白,前提是所述片段能与胶原蛋白结合。融合蛋白变体可以在所述融合蛋白的一或数个氨基酸处有修饰(例如糖基化、磷酸化、乙酰化、形成二硫键、生物素化、象荧光素标记这样的显色标记,等)。优选,变体是所述融合蛋白的同源物。用本文公开的方法可以容易地测试工程化变体与胶原蛋白结合的能力。最优选,将 SEQ ID No :1 残基 1 至 267 的多肽用作片段 (a)。然而,也可以通过交换所选择的氨基酸或通过截短所述序列而不剥夺所述功能来修饰所述多肽。

[0037] 所述融合蛋白的片段 (b) 至少满足以下目的:从产生所述融合蛋白的细胞分泌融合蛋白、以能结合胶原蛋白的形式提供片段(例如折叠或凝集状态)、亲和纯化所述融合蛋白、用抗体识别所述融合蛋白、当融合蛋白用作药物时为其提供有利的特性。令人惊奇且最为重要的是,片段 (b) 允许所述融合蛋白在哺乳动物细胞中优选在人细胞中生产,并允许其以活性形式分泌至上清液中,即以能与胶原蛋白结合的形式。片段 (b) 最优选为免疫球蛋白的 Fc 结构域。适宜的免疫球蛋白是 IgG、IgM、IgA、IgD、和 IgE。IgG 和 IgA 为优选。IgG 为最优选。所述 Fc 结构域可以是整个 Fc 结构域或其功能保守性变体。如果一个 Fc 变体保留有至少一种上述所列的片段 (b) 的功能,那么它就是功能保守性的。最优选的是 SEQ ID No. 1 残基 273 至 504 的多肽。然而,这样的多肽可以经修饰或截短而不使其丧失功能,这是一般常识。

[0038] 本发明融合蛋白的片段 (a) 和 (b) 可通过接头连接。接头可由约 1 至 100,优选 1 至 10 个氨基酸残基组成。

[0039] 最优选,所述融合蛋白具有氨基酸序列 SEQ ID No. 1(本文称作 Fc-GPVI-nt)。

[0040] 本发明进一步提供编码本发明融合蛋白的核酸序列。所述核酸序列含有选自下组的序列:

[0041] (i) SEQ ID No :2 的核酸序列或其根据简并密码编码相同多肽的变体;

[0042] (ii) 编码与由 SEQ ID No :2 编码的多肽具有至少 70%同源性的多肽的核酸序列;

[0043] (iii) 编码至少 300 个氨基酸的多肽的核酸,其中具有至少 100 个氨基酸的片段其功能是结合胶原蛋白、具有至少 200 个氨基酸的片段其功能是作为 Fc 结构域;和

[0044] (iv) 编码权利要求 1 的融合蛋白的核酸序列。

[0045] 本发明进一步提供预防或治疗动脉内血栓形成的药物,该药物包含含有糖蛋白 VI 细胞外结构域或其具有胶原蛋白结合功能的变体的蛋白质。优选地,所述蛋白质是本发

明所述的融合蛋白质。如果所述药物含有所述融合蛋白,所述药物优选进一步包含适宜的载体。所述药物优选经非肠道途径、更优选经静脉内给药。正如已由本发明人所发现的,GPVI-胶原蛋白互作是血小板与受伤血管壁粘附的主要因素。本发明的融合蛋白能通过阻断暴露于血液的胶原蛋白而不抑制血小板的其它功能,来阻止血小板在血管系统中与所述暴露于血液的胶原蛋白结合。

[0046] 作为选择,本发明的药物可以包含编码本发明所述融合蛋白的核酸以用于基因治疗。所述核酸优选包含上述定义的核酸序列。所述核酸优选包含在载体中,优选为病毒载体。可以将编码所述融合蛋白的载体导入病人的血管系统中,由此可以用其转导例如内皮细胞。适宜用于基因治疗的载体是本领域已知的。它们可以基于例如腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、或单纯疱疹病毒。根据病人的需要,可以修饰载体使转导细胞长期或短期表达融合蛋白。融合蛋白的 Fc 结构域使得融合蛋白由被转导细胞能以活性形式分泌。

[0047] 本发明进一步提供体外筛选糖蛋白 VI 与胶原蛋白结合的抑制剂的方法,包括:

[0048] (i) 提供暴露胶原蛋白的表面;

[0049] (ii) 在预先确定的允许所述融合蛋白与所述表面结合的条件下,将所述表面的一部分与本发明的融合蛋白接触;

[0050] (iii) 在与步骤 (ii) 相同的条件下将所述表面的另一部分与所述融合蛋白在测试化合物存在下进行接触;

[0051] (iv) 确定在所述测试化合物不存在和存在的情况下,与所述表面结合的所述融合蛋白的量;

[0052] (v) 如果与所述测试化合物不存在时相比该测试化合物存在时所述融合蛋白与所述表面的结合更少,则将该测试化合物鉴定为抑制剂;和

[0053] (vi) 可选地测定所述抑制剂对血小板凝集和/或血小板激活的功能效果。

[0054] 步骤 (i) 的表面可以用胶原蛋白包被的玻璃或塑料表面。所述表面的部分可以是滴定板或多孔板的板孔。暴露胶原蛋白的表面可以容易地如实施例所述通过用胶原蛋白包被玻璃或塑料表面来制备。胶原蛋白包被的板或多孔板也可从商业获得。在步骤 (ii) 中,将预先确定量的所述融合蛋白与所述表面的第一个部分在允许融合蛋白与该表面结合的条件(特别是 pH、缓冲液、温度)下接触。优选地,根据允许与所述表面的优化结合来选择条件。在步骤 (iii) 中,在预先确定量或浓度的测试化合物存在下,将表面另一部分与和步骤 (ii) 中相同量的融合蛋白、以及在相同条件下进行接触。可以使用测试化合物的不只一种量或浓度。步骤 (iv) 的所述确定优选包括,洗涤根据步骤 (ii) 和 (iii) 进行接触的所述表面部分一或多次以去除未结合的融合蛋白。之后可以通过例如测定与融合蛋白结合的荧光标记(例如荧光素、罗丹明,等)的荧光来确定已结合的融合蛋白的量。作为选择,已结合的融合蛋白可以用针对所述融合蛋白的抗体检测,其中所述抗体可以用荧光标记。作为选择,抗体可以用能产生显色或发光反应产物的酶(例如碱性磷酸酶、过氧化物酶、萤光素酶)标记。最方便的是,该融合蛋白可以用显色标记进行标记,这样与胶原蛋白结合后该标记会改变其光吸收或放射特征。在这种实施方式中,不需要洗去未结合的融合蛋白。

[0055] 在步骤 (v) 中,可以鉴定抑制剂。已鉴定的抑制剂或其已选择部分可用作改进该抑制剂的引导结构。这样的引导结构可用化学方法进行修饰,经修饰的结构可再用该筛选方法进行测试。具有改进特性的经修饰结构或测试化合物可进行选择或可选地进一步经化

学方法改变。以这种方式,可以实现对抑制剂的重复改进。用本发明筛选方法鉴定的抑制剂有用作对抗血栓形成和动脉粥样硬化的潜在药物的价值。

[0056] 在步骤(vi)中,所述抑制剂对血小板凝集和/或血小板激活的功能效应可根据下述方法进行测定,例如活体荧光显微术。

[0057] 依赖于所测试的测试化合物数量,可以小、中或大规模实施所述筛选方法。如果要测试许多测试化合物(例如化合物文库),筛选方法优选采用高通量筛选形式(HTS)。对于HTS,优选用荧光标记的融合蛋白检测已结合的融合蛋白量。

[0058] 也可用上述筛选方法筛选抑制GPVI与胶原蛋白结合的抗体,特别是对抗GPVI细胞外结构域的抗体。这样的抗体筛选可以与例如产生单克隆抗体的杂交瘤技术或其它任一产生抗体的技术相结合,由此优选将本发明的融合蛋白用作抗原。杂交瘤细胞上清液中的抗体可用作所述测试化合物。

[0059] 本发明进一步提供用本发明的融合蛋白作为免疫原产生的抗体。此外,提供了针对GPVI的抗体用于制备预防血小板在活性动脉粥样硬化损伤中粘附于暴露的内皮下基质胶原蛋白而作为急性冠状动脉或颈动脉综合征启动开关的药物的用途。这样的适应症可以根据下述进行诊断。优选地,病人进一步以患有不稳定动脉粥样硬化斑块为特征。所述药物优选经非肠道途径给药。优选地,所述抗体为单克隆抗体。这样的抗体可以例如用本发明的融合蛋白作为免疫原进行制备。

[0060] 此外,本发明提供体外筛选由GPVI介导的血小板与活性血管内损伤粘附的抑制剂的方法,所述方法包括步骤:

[0061] (i) 提供暴露胶原蛋白的表面;

[0062] (ii) 在预先确定的允许血小板粘附于胶原蛋白的条件下,将所述表面与血小板接触;

[0063] (iii) 在测试化合物存在下测定血小板的粘附;和

[0064] (iv) 如果与所述测试化合物不存在时相比该测试化合物存在时血小板与胶原蛋白的粘附更少,则将该测试化合物鉴定为GPVI的抑制剂;和

[0065] (v) 可选地测定所述抑制剂对血小板凝集和/或血小板激活的功能效果。

[0066] 该方法中使用的血小板可以根据已知的方法分离(参见实施例7)。它们可以分离自象小鼠、大鼠、兔、猪等这样的哺乳动物血液。优选地,它们分离自人。所述血小板可以用例如象荧光素这样的荧光染料标记。血小板对所述表面的粘附可以根据实施例中描述的进行测试。该方法的测试化合物可以是有机小分子。优选地,该方法的测试化合物是在上述筛选GPVI与胶原蛋白结合的抑制剂的方法中鉴定的抑制剂。以这种方式,可以显著减少将要筛选的化合物数量,而且可以提高发现对血小板有功能的抑制剂的可能性。

[0067] 也提供了体内筛选由GPVI介导的血小板与活性血管内损伤粘附的抑制剂的方法,所述方法包括步骤:

[0068] (i) 提供活性血管内损伤的体内模型;

[0069] (ii) 在测试化合物存在下测定血小板与活性血管内损伤的粘附,和

[0070] (iii) 如果与测试化合物不存在时相比在测试化合物存在下血小板与活性血管内损伤的粘附更少,则将该测试化合物鉴定为GPVI的抑制剂。

[0071] 所述体内模型可以是适宜的哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔,等。优选为小鼠。在测

试化合物存在和不存在下测定血小板与活性血管内损伤的粘附之前,将优选已用荧光标记的血小板导入模型。所述测试化合物优选已经在上述体外筛选方法之一中鉴定为抑制剂。用实施例 8 中所述的体内荧光显微术实施血小板与活性血管内损伤的粘附。

[0072] 本发明还提供融合蛋白用于制备治疗糖尿病的药物用途,该融合蛋白包括

[0073] (a) 糖蛋白 VI 细胞外结构域或其具有胶原蛋白结合功能的变体,和

[0074] (b) 免疫球蛋白的 Fc 结构域或其功能保守性部分。

[0075] 用于制备治疗糖尿病的药物融合蛋白优选为二聚体融合蛋白。为提供二聚化的可能性,在本发明的融合蛋白结构域 (a) 和 (b) 间必需存在铰链区。该铰链区对于允许多肽链的适宜定向和链间二硫键的形成是必需的。因此,铰链区必需具备充足的长度并包含半胱氨酸残基,优选至少两个半胱氨酸残基。优选地,该融合蛋白包含 SEQ IDNo:1 的残基 1 至 267。该融合蛋白用于治疗糖尿病的急性并发症或治疗糖尿病患者中的慢性动脉粥样硬化进程。优选地,该融合蛋白为 Fc-GPVI-nt。

[0076] 本发明还提供制备本发明融合蛋白 (Fc-GPVI-nt) 的方法,它包括以下步骤:

[0077] (a) 感染后 2 天收集已用编码附图 7 所示氨基酸序列的 Fc-GPVI-nt 腺病毒感染的 HeLa 细胞培养物上清液;

[0078] (b) 离心 (3800g, 30 分钟, 4°C) 步骤 (a) 的上清液;

[0079] (c) 过滤 (0.45 μm) 步骤 (b) 的上清液;

[0080] (d) 加入一倍体积的硫酸铵 (761g/l) 使免疫粘附素沉淀,并于 4°C 搅拌过夜;

[0081] (e) 离心 (3000g, 30 分钟, 4°C) 使蛋白质成团,

[0082] (f) 将步骤 (e) 中的成团蛋白质溶于 0.1 倍体积的 PBS,并在 PBS 中 4°C 透析过夜;

[0083] (g) 离心 (3000g, 30 分钟, 4°C) 使蛋白质溶液澄清;

[0084] (h) 将步骤 (g) 中的溶液上载至蛋白质 A 柱 (HiTrap™ 蛋白质 AHP, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden);

[0085] (i) 用结合缓冲液 (20mM 磷酸钠缓冲液 pH7.0, 0.02% NaN<sub>3</sub>) 洗涤柱直至 OD<sub>280</sub> < 0.01;

[0086] (k) 用洗脱缓冲液 (100mM 甘氨酸 pH2.7) 将级分洗脱;

[0087] (l) 用中和缓冲液 (1M Tris/HCl pH9.0, 0.02% NaN<sub>3</sub>) 中和洗脱的级分;

[0088] (m) 合并级分;

[0089] (n) 4°C 下将合并的级分在 PBS 中透析过夜,

[0090] (o) 将透析产物等分并于 -20°C 冷冻。

#### 附图说明

[0091] 附图 1: C57BL6/J 小鼠体内总颈动脉血管损伤后血小板的粘附和凝集。(a) 血管损伤前 (左列) 和 2 小时后 (右列) 的颈动脉扫描电镜显微图。内皮剥落诱导血小板粘附和凝集,导致血小板富集 (左下图) 的血栓形成。(b) 血管损伤 5 分钟后用体内原位颈总动脉荧光显微术调查血小板-内皮细胞互作 (黑柱)。以没有血管损伤的动物作对照 (空柱)。左和右列分别概括了各组八个试验的瞬间和稳定血小板粘附。血小板根据它们与前述<sup>24</sup>内皮细胞系的相互作用进行分类,并以每 mm<sup>2</sup> 的血管表面给出。平均值 ± s. e. m., 星号表示与对照相比的显著差异, P < 0.05。(c) 血管损伤后的血小板凝集根据体内荧光显微

术测定（黑柱）。以没有血管损伤的动物作对照（空柱）。平均值  $\pm$  s. e. m. , 各组  $n = 8$ , 星号表示与野生型小鼠相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。显微照片（右）显示对照动物中（上图）或血管损伤后（下图）的典型荧光显微镜图像。白箭头指示粘附的血小板。

[0092] 附图 2 :对 GPVI 的抑制废除了血管损伤后的血小板粘附和凝集。(a) 用活体内视频荧光显微镜检测血管损伤后的血小板粘附。荧光血小板与  $50 \mu\text{g/ml}$  抗 -GPVI (JAQ1) Fab 片段或对照大鼠 IgG 预孵育。未经 mAb 预孵育的血小板用作对照。左图和右图分别概括了瞬间和稳定血小板粘附。平均值  $\pm$  s. e. m. , 各组  $n = 8$ , 星号表示与对照相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(b) 图示了在初始粘连 / 缓慢表面易位后形成不可逆粘附的血小板百分数。(c) 体内血管损伤后的血小板凝集。根据用所述的荧光显微镜评估与 tyrodes、无关大鼠 IgG、或抗 -GPVI Fab (JAQ1) 预孵育的血小板凝集。平均值  $\pm$  s. e. m. , 各组  $n = 8$ , 星号表示与对照相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(d) 显微照片显示阐明在不存在或存在抗 GPVI Fab (JAQ1) 或对照 IgG 时血小板粘附的代表性体内荧光显微镜图形。

[0093] 附图 3 :GPVI 缺陷型小鼠中内皮脱落后的血小板粘附。(a) 经 JAQ1 处理的小鼠缺乏 GPVI。上图 :将经无关对照 IgG (左) 或抗 GPVI (JAQ1) (右) 预处理的小鼠的血小板于室温下与 FITC 标记的 JAQ1 和 PE 标记的抗小鼠 CD41 孵育 10 分钟, 并直接在 FACScan™ 上分析。给出了每组 3 只小鼠的代表性点杂交印迹。下图 :在非还原条件下用 SDS-PAGE 对三个对照 IgG 或 JAQ1 处理的小鼠的全血小板溶解产物进行分离, 并用 FITC- 标记的 JAQ1 进行免疫印迹, 之后与 HRP- 标记的兔抗 -FITC mAb 孵育。(b) 对照动物 (上图) 或 GPVI 缺失小鼠 (下图) 中血管损伤 2 小时后的颈动脉扫描电子显微图。对照动物中内皮脱落诱导了血小板粘附和血小板凝集。相反, 在 GPVI 缺失小鼠中只有非常少的血小板沿受损血管壁附着。沿剥落区可见内皮下胶原蛋白纤维。(c) 血小板粘连和稳定的血小板粘附, (d) 初始粘连向稳定捕获的转换 (粘连的血小板的百分数), 和 (e) 在 GPVI 缺陷 (JAQ1 预处理的小鼠) 或对照 IgG 预处理的小鼠中测定了颈动脉血管损伤后的血小板凝集 (详见材料和方法)。该图概括了各组八个试验中的血小板粘附 (瞬间的和稳定的) 以及血小板凝集。平均值  $\pm$  s. e. m. , 星号指示与对照 IgG 相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(f) 显微照片显示, 阐明 GPVI 缺陷 (JAQ1) 和对照 IgG 处理的小鼠中血小板粘附的代表性体内荧光显微镜图形。

[0094] 附图 4 :离体评估在生理流条件下血小板对经胶原蛋白包被的玻璃盖玻片表面的粘附。左图 :在生理流条件下调查来自经无关对照 IgG 免疫粘附素 (对照) (左) 或抗 GPVI 免疫粘附素 (Fc-GPVI-nt) (右) 预处理小鼠的血小板。在各试验末期经 FACS 对洗涤过的盖玻片计数来评估血小板数量。流式条件下于 30 秒后评估作为血小板粘附第一步的血小板粘连 (tethering), 5 分钟后评估稳定的血小板粘附。(详见实施例 6)。图版概括了各组八个试验中的瞬间和稳定血小板粘附。平均值  $\pm$  s. e. m. , 星号指示与对照 IgG 相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。

[0095] 附图 5 :在一项以 ELISA 为基础的检测中监控 Fc-GPVI-nt 与胶原蛋白的相互作用。调查了由 GPVI 细胞外结构域和 IgG Fc 部分组成的免疫粘附素 Fc-GPVI-nt 与经胶原蛋白包被的板间的粘附, 其中 Fc-GPVI-nt 和浓度逐渐升高 ( $0.5 \mu\text{g}$  到  $10 \mu\text{g}$ )。用针对 Fc-GPVI-nt 的 Fc 部分的并且经过氧化物酶标记的二级抗体将这一结合可视化。最后用 ELISA 探测过氧化物酶。在该代表性试验中, Fc-GPVI-nt 与胶原蛋白的结合用充分的亲和力进行控制, 在  $\mu\text{g}$  浓度处达到饱和。

[0096] 附图 6 :用抑制性抗小鼠 GPVI 抗体 JAQ1 证实 Fc-GPVI-nt 与胶原蛋白间的相互作用和筛选 GPVI 抑制剂的可能性。Fc-GPVI-nt ( $2 \mu\text{g}/\text{孔}$ ) 与胶原蛋白包被的 ELISA 板间的粘附被显示为特异性的 :单独免疫粘附素 Fc-nt 不显示任何结合。因此,这为以上升至高通量能力的潜力来筛选针对 GPVI 抑制剂提供了以 ELISA 为基础的检测方法。

[0097] 附图 7 :Fc-GPVI-nt 的氨基酸序列 :SEQ ID No :1。

[0098] 附图 8 :免疫粘附素 Fc-GPVI-nt 的 DNA 序列 :SEQ ID No.2。碱基 1 至 807 编码 GPVI 细胞外结构域。碱基 817 至 1515 编码 IgG 的 Fc 部分。

[0099] 附图 9 :GPVI-Fc 的表征。(a) 上图 :Fc-GPVI-nt 和缺少细胞外 GPVI 结构域的对照 Fc 用于还原条件下的 SDS-PAGE。考马斯蓝染色 (左) 以及与过氧化物酶偶联的山羊抗人 Fc 抗体的免疫印迹 (右) 将 Fc-GPVI-nt 分子量鉴定为  $\sim 80\text{kDa}$ 。中图 :用抗 -GPVI 单克隆抗体 5C4 与 Fc、Fc-GPVI-nt、或人血小板进行的免疫印迹。5C4 检测到了腺病毒表达的 Fc-GPVI-nt 融合蛋白和血小板 GPVI,但是不检测对照 Fc。下图 :还原 (右) 和非还原 (左) 条件下的分子量。尽管在还原条件下 Fc-GPVI-nt 的分子量约为  $80\text{kDa}$ ,在非还原条件下完整 nt 鉴定为  $\sim 160\text{kDa}$  的蛋白质。(b-d)Fc-GPVI-nt 胶原蛋白互作的表征。(b) 用不同浓度的可溶 Fc-GPVI-nt 和固定化胶原蛋白 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 完成结合检测以定义 Fc-GPVI-nt-胶原蛋白互作。结合的 Fc-GPVI-nt 用抗 -Fc mAb 抗体 ( $1 : 10000$  稀释) 进行了检测,并以相对于在  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  Fc-GPVI-nt 处观察到的结合给出。Fc-GPVI-nt 以可饱和方式与胶原蛋白结合。平均值  $\pm$  s. e. m.,  $n = 6$  个 Fc-GPVI-nt 浓度,星号指示与  $0 \mu\text{g}/\text{ml}$  Fc-GPVI-nt 相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(c, 左图) 显示 Fc-GPVI-nt ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 与各种底物的结合。Fc-GPVI-nt 与 BSA ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或 vWF ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的结合以 GPVI-二聚体与固定化胶原蛋白的结合的百分数给出。BSA 或 vWF 未出现与 Fc-GPVI-nt 的结合,这支持 Fc-GPVI-nt 的结合特异性。平均值  $\pm$  s. e. m.,星号指示与胶原蛋白相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(c, 右图) 图示了 Fc-GPVI-nt ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或 Fc ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 与固定化胶原蛋白 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的结合。结合的 Fc-GPVI-nt 或 Fc 用抗 -Fc mAb 抗体 ( $1 : 10000$  稀释) 进行了检测,并以相对于观察到的 Fc-GPVI-nt 结合给出。只有 Fc-GPVI-nt,而不是 Fc 或抗 -Fc mAb 与固定化的胶原蛋白结合。平均值  $\pm$  s. e. m.,各组  $n = 8$ ,星号指示与 Fc-GPVI-nt 结合的显著差异,  $P < 0.05$ 。(d) Fc-GPVI-nt ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 与不同浓度的可溶胶原蛋白预孵育 10 分钟。孵育后洗涤板,并用过氧化物酶偶联的山羊抗人 IgG 抗体 ( $1 : 10000$  稀释) 检测 Fc-GPVI-nt 结合。Fc-GPVI-nt 的结合以相对于不存在可溶胶原蛋白时观察到的结合给出。可溶性胶原蛋白以剂量依赖方式抑制 GPVI-Fc-二聚体-二聚体与固定化胶原蛋白的结合。平均值  $\pm$  s. e. m.,  $n = 3$  个胶原蛋白浓度,星号指示与  $0\text{mg}/\text{ml}$  胶原蛋白相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(e) 通过直接比较来评估 GPVI-Fc 融合蛋白单体形式与 Fc-GPVI-nt 间的结合亲和力差异。在用 I 型胶原蛋白包被的 ELISA 板上评估单体和二聚体的结合。升高的 GPVI 融合蛋白浓度以可饱和方式与胶原蛋白结合。此处,亲和评估给出了一个 LinewaverBurke 图 (e)。单体 GPVI 融合蛋白的亲和力比等摩尔浓度二聚体形式 Fc-GPVI-nt 约低 10 倍。

[0100] 附图 10 :Fc-GPVI-nt 抑制 CD 62P 在人血小板上的激活,这一激活被看作通过提高胶原蛋白的剂量从  $\alpha$  颗粒释放细胞内递质的参数。人血小板分离自全血并与 PE 标记的抗 -CD 62 抗体孵育 (详见材料和方法)。在 Becton Dickenson FACS 装置中检测荧光。示出代表性柱形图。在对照 Fc 蛋白 ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;蓝线) 存在下,从  $0$  至  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  逐渐升高

的胶原蛋白浓度诱导了荧光的转变。在 Fc-GPVI-nt (100  $\mu$ g/ml ;红线) 存在下, 荧光的转变及由此的 CD 62P 激活被显著抑制。

[0101] 附图 11 :Fc-GPVI-nt 对由胶原蛋白介导的血小板凝集和内源递质从致密和  $\alpha$  颗粒中释放的特异性抑制。(a) 将人血小板与对照 Fc (80  $\mu$ g/ml) 或 Fc-GPVI-nt (80  $\mu$ g/ml) 孵育。用胶原蛋白 (1  $\mu$ g/ml) 或 ADP (5  $\mu$ M) 或 TRAP (10  $\mu$ M) 诱导血小板凝集, 并于搅拌条件下在凝集测量器 (aggregometer) 中测定凝集 (详见材料和方法)。作了三次从  $n = 5$  个不同血液供体的测定。平均值  $\pm$  s. e. m 以相对于不含融合蛋白的对照凝集的凝集百分比给出。(b) 与对照 Fc (80  $\mu$ g/ml) 或 Fc-MGPVI-nt (80  $\mu$ g/ml) 孵育后在同一探测器中同时测定 ATP 释放。ATP 释放量以不含融合蛋白的对照的百分比给出。(c) 在基本条件下、并用胶原蛋白 (20  $\mu$ g/ml) 刺激后用特异于人 PDMGF 的 ELISA 系统测定人血小板中的 PDMGF 释放 (详见材料和方法)。与对照 Fc 的预孵育对从经胶原蛋白刺激的血小板中释放 PDMGF 没有显著影响, 而 Fc-MGPVI-nt (100  $\mu$ g/ml) 显著降低 PDMGF 释放。在未经刺激的血小板中未出现对 PDMGF 释放的抑制。

[0102] 附图 12 :Fc-GPVI-nt 对离体人类血液的流血时间没有显著影响。ADP/ 胶原蛋白刺激和肾上腺素 / 胶原蛋白刺激后在 PFA-100 装置中离体测定人血液的流血时间。Fc-GPVI-nt (5 和 20  $\mu$ g/ml) 和 Fc (5 和 20  $\mu$ g/ml) 不会延长流血时间, 而两种条件下治疗相关浓度 (5  $\mu$ g/ml) 的 ReoPro<sup>R</sup> 最大限度地延长流血时间。概括了从  $n = 4$  个血液供体三次测定的平均值  $\pm$  s. e. m.。

[0103] 附图 13 :Fc-GPVI-nt 在流式条件 (flow condition) 下抑制血小板粘附于固定化的胶原蛋白。人血小板 ( $2 \times 10^8$  细胞 /ml) 分离自全血 (详见材料和方法)。将板用固定化的胶原蛋白 (10  $\mu$ g/ml) 或 vWF (10  $\mu$ g/ml) 包被。在平行板流式腔中在 Fc-GPVI-nt 或缺乏细胞外 GPVI 结构域的 Fc (200  $\mu$ g/ml) 存在下检测血小板与包被板的粘附。Fc-GPVI-nt 对血小板粘附的抑制以对照 (Fc 对照) 的百分比给出。在剪切率分别为 500  $\text{秒}^{-1}$  和 1000  $\text{秒}^{-1}$  时, Fc-GPVI-nt 显著削弱血小板在固定化胶原蛋白上的粘附。相反, Fc-GPVI-nt 未影响血小板在固定化 vWF 上的粘附。平均值  $\pm$  s. e. m., 各组  $n = 4$ , 星号指示与对照 Fc 相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。下图显示代表性的显微图像。

[0104] 附图 14 :腹膜内注射至小鼠体内后, Fc-GPVI-nt 具有延长的血浆半衰期以及有利的药物代谢动力学。用特异性抗 Fc 抗体和 ELISA 测定 Fc-GPVI-nt 的血液浓度 (详情请参见材料和方法)。(a) 单次 Fc-GPVI-nt 腹膜内注射 (4  $\mu$ g/g) 导致 Fc-GPVI-nt 在 24 小时后快速达到峰值血液浓度, 其后 Fc-GPVI-nt 血液浓度缓慢降落。示范了来自 10 种动物的平均值  $\pm$  s. e. m.。(b) 重复腹膜内应用 (10  $\mu$ g/g ;每周两次) 导致 Fc-GPVI-nt 在小鼠体内连续累积超过 28 天。示范了来自 6 种动物的平均值  $\pm$  s. e. m.。(c) 每只小鼠静脉内单剂量注射 30  $\mu$ g Fc-GPVI-nt (1  $\mu$ g/g 体重)、60  $\mu$ g (2  $\mu$ g/g 体重) 和 100  $\mu$ g Fc-GPVI-nt (3  $\mu$ g/g 体重) 导致剂量依赖性的免疫粘附素血浆浓度升高。在这些小鼠体内两个较高剂量下的血浆浓度在 5 至 60 分钟时达到延长的提升水平, 24 小时后足够有效清除胶原蛋白及由此有效抑制血小板上 GPVI 受体的激活。示范了来自 5 种动物的平均值  $\pm$  s. e. m.。

[0105] 附图 15 :Fc-GPVI-nt 在体内对血小板粘附和凝集的效果。(a) 小鼠 (各组  $n = 6$ ) 用 2mg/kg 或 4mg/kg Fc-GPVI-nt 静脉内处理。将经 Integrilin (0, 2mg/kg) 处理的小鼠用作阳性对照 ( $n = 8$ )。根据所述方法 (参见材料和方法) 测定流血时间。与对照动物相比

Fc-GPVI-nt 融合蛋白未曾提高尾部流血时间。在经 Integrilin 处理的小鼠,尾部流血时间被大大延长。 $**P < 0.05$  vs. 对照。(b) 对 GPVI 的抑制废除了血管损伤后血小板的粘附和凝集。用活体视频荧光显微术测定血管损伤后的血小板粘附。小鼠用 1 或 2mg/kg Fc-GPVI-nt 或等摩尔量的对照 Fc 预处理。左和右图分别概括了血小板粘连和稳定血小板粘附。平均值  $\pm$  s. e. m., 各组  $n = 5$ , 星号指示与 Fc 相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(c) Fc-GPVI-nt 对体内血管损伤后血栓形成的影响。根据所述用荧光显微术评估了血小板血栓数量(右)和总血栓区域(左)。平均值  $\pm$  s. e. m., 各组  $n = 5$ , 星号指示与 Fc 相比的显著差异,  $P < 0.05$ 。(d) 显微照片显示代表性的体内荧光显微图像, 这些图像图示了在 1 或 2mg/kg Fc-GPVI-nt 或对照 Fc 存在下的血小板粘附。标尺代表  $50 \mu\text{m}$ 。(e) 在经 Fc 或 Fc-GPVI-nt 处理过的动物中血管损伤 1 小时后的颈动脉扫描电镜图。在经 Fc 处理过的小鼠中, 内皮脱落诱导血小板粘附和血小板凝集。相反, 在经 Fc-GPVI-nt 处理过的小鼠中仅有非常少的血小板沿受损血管壁附着。沿脱落区域可见内皮下胶原蛋白纤维。标尺代表  $10 \mu\text{m}$ 。(f) Fc-GPVI-nt 特异性结合于颈动脉内皮下层。在经过氧化物酶耦联的山羊抗人 IgG 抗体染色的颈动脉切片上检测到 Fc-GPVI-nt 与内皮下层的这一结合。将获自经 Fc- 处理的小鼠的颈动脉用作对照。根据棕色染色的指示, 在内皮下层检测到了 Fc-GPVI-nt 而非 Fc 对照蛋白。原始放大: 100 倍。

[0106] 附图 16 : Fc-GPVI-nt 显著减弱 apo e<sup>-/-</sup> 敲除小鼠体内的动脉粥样硬化进程。Apo e<sup>-/-</sup> 小鼠用 Fc-GPVI-nt ( $4 \mu\text{g/g}$ ) 或对照 Fc ( $4 \mu\text{g/g}$ ) 腹膜内处理四周, 每周两次。用苏丹红对大血管染色以使粥样斑和斑块形成可视化后, mortem 后调查动脉粥样硬化进程。在对照动物中, 特别是分支区域中的红色指示颈动脉标本广泛的斑块形成。在经 Fc-GPVI-nt 处理的动物中, apo e<sup>-/-</sup> 小鼠颈动脉中的动脉粥样硬化几乎完全被废除了。显示了用 Fc-GPVI-nt (左侧) 处理四周后的 apo e<sup>-/-</sup> 小鼠和用对照 Fc 蛋白 (右侧) 处理四周后的 apo e<sup>-/-</sup> 小鼠的有代表性的肉眼可见的整个颈动脉血管标本。

[0107] 附图 17 : 从糖尿病患者新鲜分离的血小板显示降低的纤维蛋白原受体 (CD61, 顶部) 表达、和增强的 Fc 受体 (CD32, 中间) 表达以及由此而增强的 GPVI 的表达。CD32 表达与 GPVI 表达 (由特异性单克隆抗体 4C9 检测) 间的相关性显示在人血小板上 (底部)。人血小板分离自糖尿病患者的全血, 并与荧光标记的抗 -CD61 和抗 CD32 抗体或 FITC 标记的 4C9 抗体孵育。在 Becton Dickenson FACScalibur 装置中检测荧光。概括了来自  $n = 11$  名患糖尿病的病人和来自  $n = 363$  名未患糖尿病的病入的平均值  $\pm$  s. e. m.。计算 CD32 荧光与 4C9 荧光的相关性, 相关系数  $r = 0.516$ 。

[0108] 附图 18 : 基于 Fc-GPVI-nt 的单体融合蛋白的氨基酸序列。

[0109] 发明详述

[0110] 以前的一种假说曾提出, 与 von vWf 结合的血小板糖蛋白 VI (GP) Ib 将流动的血小板招募至受伤血管壁 (Ruggeri, Z. M.: Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemost.* 1997; 78, 611-616), 而内皮下纤维状胶原蛋白支持血小板的稳定粘附和激活 (van Zanten, G. H. 等人, Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin. Invest* 1994; 93, 615-632; Clemetson, K. J. & Clemetson, J. M. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 2001, 86, 189-197)。然而, 本发明通过对小鼠颈动脉的荧光电子显微术证实, 内皮糜烂后对主要血小

板胶原蛋白受体 GPVI 的抑制或使其缺失反而废除血小板 - 血管壁间的互作。出乎意料的是,对 GPVI 的抑制使血小板在内皮下层上的粘连和粘附降低约 89%。此外,在这些条件下基本上废除了对血小板的稳定捕获和凝集。在这些过程中严格需要 GPVI,这在 GPVI 缺陷型小鼠中得到证实,这些小鼠中血小板也未能附着和凝集到受损血管壁上。这些发现揭示了 GPVI 在引发血小板附着至血管损伤部位中的一种意想不到的作用,并明确地将血小板 - 胶原蛋白互作鉴定为由动脉血小板诱导的动脉粥样硬化并发症的主要决定因素。

[0111] GPVI 通常作为内皮下基质胶原蛋白的受体起作用,这一事实已经得到描述 (Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 1989; 84:1440-1445)。这些作者描述了体外源自 GPVI 受体缺陷病人的血小板的特征。然而,胶原蛋白与 GPVI 受体在体内环境中的互作的生理重要性、以及 GPVI 受体对血管损伤后粘附的相对贡献是未知的。特别是,不知道对该受体的抑制会抑制血管内血栓形成中的关键步骤——即血小板粘连。本发明揭示了,GPVI 受体是血小板在体内经内皮下基质胶原蛋白粘附至内皮下层的必需受体。在各种其它血小板表面受体蛋白例如 GPIb (von Willebrand 受体)、 $\alpha$  II $\beta$  3 整合素受体、 $\alpha$  2 $\beta$  1 整合素或 GPV 受体中,我们已经令人惊讶地将 GPVI 受体鉴定为介导血小板粘附至血管壁的必需受体。由于血小板粘附是在生理剪切压力下血小板凝集和动脉内血栓形成的第一个且最为重要的步骤,因此以下导致动脉内阻塞的有害效果是心肌梗死或脑中风险临床综合征的功能性基础。在慢性情况下,血小板和内皮的相互作用促进动脉粥样硬化的早期步骤。我们的发明还第一次显示,GPVI 受体在几个血小板表面蛋白的复杂种类中对最初的血小板粘附和动脉粥样硬化发展中的慢性血小板 - 内皮互作起关键作用。

[0112] WO 01/16321 和 WO 01/00810 公开了人 GPVI 受体的 DNA 和蛋白质序列。然而,内皮损伤对血小板粘附和激活的重要性还未曾在体内背景中得到证实。

[0113] US 6,383,779 公开了 GPVI 融合蛋白。然而,该文献并未公开二聚体融合蛋白或 GPVI 的任何治疗效果。

[0114] 近来,调查了体外灌注的条件下人造胶原蛋白上的血小板 - 胶原蛋白互作的不同相 (Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tzomiyama Y, Ordinas A 和 Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 1997;88:2081-2092)。该研究的作者已经指出剪切压力条件下胶原蛋白 - GPVI 互作的重要性。然而,在该体外人工环境下无法研究内皮下基质胶原蛋白与粘附的相关性。作为他们的体外模型的有限相关性的结果,上述研究的作者得出结论认为,GPVI 受体涉及血小板激活而不涉及血小板对内皮的粘附。相反, von Willebrand GPIb 受体显著涉及血小板 - 内皮下层互作。在一份对现有文献的综述里,这些作者汇集了所有可获得的关于血小板 - 胶原蛋白互作的信息。之前, Moroi M 和 Jung, SM (Platelet receptors for collagen. *Thromb. Haemost.* 1997;78:439-444) 已经讨论了为血小板粘附和血栓形成而发生的胶原蛋白纤维与血小板上不同的胶原蛋白受体间的互作。然而,作者并未预计在临床相关的体内环境中 GPVI 受体对于粘附的相关作用,因为他们不能确认不同胶原蛋白受体对粘附过程的重要性。

[0115] 因此,本发明提供抑制血小板-内皮下层互作和血小板粘附相关靶物而不激发出不期望的出血并发症副作用这一问题的解决办法。除了熟知的经 GPVI 受体的胶原蛋白-血小板互作,我们可以提供根据体内血小板粘附测定的天然内皮下基质与血小板互作的资料。接着,我们可以证实 GPVI-内皮互作作为血管内血栓形成最初步骤对于血小板粘附的重要性。因此,我们的发明解决用有效的抗血小板药物治疗血小板粘附的重要问题而不带有不期望的副作用问题。

[0116] 进一步,本发明提供一种免疫粘附素(本发明的融合蛋白)。在一个特定实施方式中,该免疫粘附素由 GPVI 受体细胞外结构域和 IgG 免疫球蛋白(Fc-GPVI-nt)的 Fc 部分一起组成。这一新融合蛋白以约 50%的以前公开的 GPVI 原始 DNA 序列为基础。该免疫粘附素的蛋白质结构是新的,因为该重组融合蛋白不形成象 GPVI 受体那样的膜蛋白,而是一种由各自宿主细胞释放的可溶的、免疫球蛋白样免疫粘附素。该免疫粘附素可以阻断胶原蛋白与 GPVI 的配体-受体互作。我们的结果证实,该免疫粘附素对由胶原蛋白刺激诱导的血小板主要生理功能有显著影响。胶原蛋白诱导的凝集、粘附和释放功能能被该免疫粘附素以与特异性单克隆抗体相同的程度抑制。然而,这一机制是不同的:抗体通过与 GPVI 受体的配体结合位点直接结合来抑制 GPVI 激活,而该免疫粘附素清除 GPVI 配体胶原蛋白并由此防止由配体介导的 GPVI 激活。

[0117] 本发明的免疫粘附素是新的 GPVI 抑制剂。它具有通过配体清除而选择性抑制由 GPVI 介导的效应的激活支路的优势。次级效应,象由抗体介导的对 GPVI 受体内化的效应,被阻止。Fc-GPVI-nt 可用于治疗由带有斑块破裂或内皮损伤的不稳定动脉粥样硬化斑块引起的动脉粥样硬化并发症。因此,免疫粘附素 Fc-GPVI-nt 用作由胶原蛋白介导的 GPVI 激活的治疗性抑制剂而不影响 GPVI 受体对相关信号系统的内在活性。

[0118] 此外,GPVI 免疫粘附素用作抗体选择的一种理想的表位。Fc 部分使得可以对蛋白质进行方便的纯化以及将其固定到表面以对抗体文库(即通过噬菌体展示)进行大规模抗体选择。这一选择可以选择性筛选针对具有与天然蛋白质相似的结构、代表完整蛋白的相关表位的抗体。

[0119] 最后,Fc-GPVI-nt 是筛选 GPVI 受体激活的抑制剂的重要工具。我们已经建立了一种以 ELISA-为基础、通过以经胶原蛋白预包被的板为配体模拟胶原蛋白 GPVI 互作的体外检测方法。这种检测方法也可以用荧光标记的 Fc-GPVI-nt 进行,且由此可以扩展为高通量形式。这种检测方法可以通过荧光测定来筛选抑制性抗体或具有抑制 GPVI 功能的潜力的小分子。用这种无细胞筛选检测方法,已经为药物测试建立了一种可高通量化的荧光筛选检测方法的原型方法。

[0120] 基于近来通过血管内超声或核磁共振成像在成像技术中的发展,有可能鉴定动脉粥样硬化患者是否处于象急性冠状动脉或颈动脉综合征这样的急性临床并发症的危险之中,由此急性损伤会成为患者血管内血栓形成的可能原因。因而,借助本发明有可能通过施用含有针对血小板糖蛋白 VI(GPVI)的抗体来预防血管内血栓形成而不带有不期望的副作用。

[0121] 活性损伤是以内皮下基质胶原蛋白的暴露和血小板活化为特征的。可以通过例如血管内超声或温度记录(例如,Fayed 和 Fuster,Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque,Circulation 2001;89:305-316)或核磁共振成像

(Helft 等人, Progression and Regression of Atherosclerotic Lesions. Circulation 2002 ;105 :993-998) 来调查这样的损伤的出现。这样的损伤在急性冠状动脉或颈动脉综合征患者中是极有可能产生的,例如心肌梗死或中风这样的急性临床并发症的复发风险是很高的,这种风险随着与首次事件的时间间距延长逐渐降低。

[0122] 因此,本发明提供一种治疗患有急性冠状动脉或颈动脉综合征的病人的方法,所述方法包括以下步骤以避免血管内血栓形成:

[0123] (a) 确定病人体内存在或不存在活性血管内损伤;和

[0124] (b) 如果存在血管内损伤则用针对血小板糖蛋白 VI (GPVI) 的抗体治疗病人。

[0125] 此外,基于本发明,有可能治疗由于复杂动脉粥样硬化斑块破裂而处于血管内血栓形成风险的病人。这一破裂还会使内皮下胶原蛋白基质暴露。动脉内血栓形成的一个后果是,上述重要的、危及生命的临床综合征阻断对重要器官的灌注。

[0126] 本发明还提供治疗患有慢性动脉粥样硬化综合征的病人的方法,所述方法包括以下步骤以避免血管内血栓形成:

[0127] (a) 确定病人体内存在或不存在动脉粥样硬化进程发作;和

[0128] (b) 如果存在血管内损伤则用针对血小板糖蛋白 VI (GPVI) 的抗体治疗病人。

[0129] 因此,基于本发明,有可能治疗处于动脉粥样硬化风险的病人。为预防动脉粥样硬化发展,用本发明的融合蛋白治疗病人以预防血小板与暴露的内皮下胶原蛋白间的互动。本发明的融合蛋白阻断血管壁(例如内皮下层)中的 GPVI 血小板受体的配体,这样就可以抑制血小板与暴露的胶原蛋白间的互动。

[0130] 本发明的融合蛋白可以是冻干粉形式,在将其施用给病人之前将之分散在适宜的药学可接受液体载体中。如果对急性并发症的治疗优选经动脉内或静脉内给药,本发明的融合蛋白也可以被整合入适宜经非肠道途径给药的药物组合物。这样的组合物通常包括融合蛋白和药学可接受载体。药学可接受载体包括在药物给药上相容的溶剂、分散介质、抗细菌和抗真菌剂以及等渗剂。本发明包括生产治疗慢性或急性心血管疾病的药物组合物的方法。这样的方法包括将药学可接受载体与本发明融合蛋白配制在一起。对于急性心血管疾病的治疗,组合物优选经静脉内或动脉内给药。对于慢性心血管疾病的治疗,组合物也可以经皮下或腹膜内给药。这样的组合物可以进一步包括其它的活性化合物,例如另外的多肽(例如胰岛素)或治疗性活性小分子。因此,本发明进一步包括通过将药学可接受载体和本发明的融合蛋白以及一或多种其它的活性化合物例如胰岛素配制在一起而制备药物组合物的方法。对于融合蛋白和胰岛素的共同配制以治疗糖尿病患者,优选其剂量形式允许分别储存不同的蛋白,而仅在该组合物施用前完成蛋白质的混合。因此,考虑了应用多室注射器。本发明的药物组合物被配制与目的非肠道给药途径相容。非肠道给药途径的例子包括,例如动脉内和静脉内给药。用于非肠道给药的溶液或悬液可以包括无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液、聚乙二醇、固定油、丙三醇、丙二醇、TWEEN 或其它合成溶剂;抗细菌剂,例如苯基醇或羟苯甲酸甲酯;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸或重亚硫酸钠;缓冲液,例如醋酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐,和调节渗透压的试剂,例如氯化钠、葡萄糖、蔗糖、甘露糖。pH 可以用酸或碱调节,例如盐酸或氢氧化钠。非肠道制剂可以封装在用玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量小药瓶中。适于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于

静脉内注射,适宜载体包括生理盐水、抑菌水、或磷酸盐缓冲液 (PBS)。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇 (例如,丙三醇、丙二醇、和液体聚乙二醇) 的溶剂或分散介质,及其适宜的混合物。可以通过,例如利用卵磷脂包被、保持分散液中所需的颗粒大小、以及使用表面活性剂,来保持适当的流动性。可以用各种抗细菌或抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞,及类似,来实现对微生物作用的预防。在许多情况下,优选组合中包括等渗剂,例如,糖类、多元醇例如甘露醇、山梨醇、氯化钠。可以通过在组合中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝或明胶,来延长对可注射组合物的吸收。根据需要,可以将活性化合物 (例如,多肽或抗体) 以所需量同以上列举成分的一或多种组合整合进适宜的溶剂接着过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。一般,通过将活性化合物整合进无菌载体来制备分散液,该无菌载体含有基本分散介质和所需的以上列举的其它成分。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冻干,该法从其预先无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其它想要的成分的粉末。特别有利的是以剂量单位形式配制口服或非肠道途径的组合物。剂量单位形式是适于以单元剂量施用给病人的独立单位。各单位含有产生预期治疗效应的预先确定量的活性化合物以及所需的药物载体。治疗急性并发症的融合蛋白有效治疗剂量 (即,有效剂量) 是从 0.05 至 5mg/kg 体重,优选 0.1 至 2mg/kg 体重,更优选 0.1 至 1mg/kg 体重。治疗慢性动脉粥样硬化发展的融合蛋白有效治疗剂量 (即,有效剂量) 是从 0.5 至 6mg/kg 体重,优选 1 至 5mg/kg 体重,更优选 2 至 5mg/kg 体重。用治疗有效量的融合蛋白对对象进行的治疗可包括单次治疗,优选,可包括一系列治疗。在优选实施例中,针对慢性动脉粥样硬化进程以 0.5 至 6mg/kg 体重,优选 1 至 5mg/kg 体重,更优选 2 至 5mg/kg 体重,每周至少两次用本发明融合蛋白治疗对象。

[0131] 调查血小板-胶原蛋白相互作用和由抑制剂调节的方法

[0132] 血小板凝集和 ATP 释放

[0133] 用 0.2 至 4  $\mu$ g/ml 升高浓度的 I 型牛胶原蛋白刺激小鼠血小板富集的血浆,引发 2 至 95% 的剂量依赖型凝集和剂量依赖型的 0 至 1.66nM ATP 释放。选择胶原蛋白的半最大浓度进行进一步试验。将特异性抗小鼠 GPVI 抗体 JAQ1 (50  $\mu$ g/ml 和 100  $\mu$ g/ml) 与小鼠血小板富集的血浆孵育几乎完全废除了用 2  $\mu$ g 胶原蛋白/ml (对 50  $\mu$ g JAQ1 :2+/-0.7 ;对 100  $\mu$ g JAQ1 :1.5+/-0.3%) 刺激后的血小板凝集。此外,ATP 释放以剂量依赖方式被抑制至 1.09nM ATP (10  $\mu$ g 抗体/ml) 或全部废除 (50 和 100  $\mu$ g 抗体/ml)。

[0134] 类似地,用 GPVI 的免疫粘附素 (Fc-GPVI-nt) (50  $\mu$ g/ml 和 100  $\mu$ g/ml) 孵育小鼠血小板富集的血浆几乎完全废除了用 2  $\mu$ g 胶原蛋白/ml (对 50  $\mu$ g Fc-GPVI-nt :2+/-0.7 ;对 100  $\mu$ g Fc-GPVI-nt :1.5+/-0.3%) 刺激后的血小板凝集,而且 ATP 释放为 0nM ATP。

[0135] 因此,免疫粘附素通过清除天然 GPVI 配体胶原蛋白而充分抑制 GPVI 激活。正如由 ATP 释放所测定的,关键的血小板功能凝集和血小板释放机制都可能被 Fc-GPVI-nt 影响。

[0136] 生理流条件下由 GPVI 介导的粘附 (流式腔)

[0137] 在流式腔中测试生理剪切条件下的血小板粘附。加入 Fc-GPVI-nt 免疫粘附素将初始和稳定的血小板粘附抑制了 60% (参见附图 4)。

[0138] GPVI 结合检测

[0139] 在以 ELISA 为基础的荧光检测法中检测 Fc-GPVI-nt 对胶原蛋白包被的板的粘附。在 0.2 至 10  $\mu$ g 浓度的 Fc-GPVI-nt 下,免疫粘附素 Fc-GPVI-nt 的结合以剂量依赖的方式

上升至饱和水平（请参见附图 5）。通过比较 Fc-GPVI-nt 的结合与空免疫粘附素 Fc-nt 或未包被塑料表面的结合证实了特异性（参见附图 6）。

#### [0140] 在血管损伤处体内调查血小板粘附和凝集作为急性血管事件中血小板激活关键步骤的方法

[0141] 为测试体内损伤粘附过程中血小板-胶原蛋白互作的生物学重要性，评估了小鼠颈动脉血管损伤后的血小板-血管壁互作。对这一重要血管床的血管损伤可以用作动脉粥样硬化最初步骤，例如动脉粥样硬化早期阶段的内皮损伤或伴随胶原蛋白纤维从内皮下层暴露的动脉粥样硬化后期阶段的斑块破裂，的模型。此外，该模型允许对血管损伤后的并发症进行研究。小的内皮损伤导致伴随着之后的血小板粘附和凝集步骤的对血小板的最大激活。在进一步的步骤中，血小板凝集可以导致颈动脉栓塞和之后的缺血性脑中风。因此，这一试验设置用作患有涉及导致急性冠状动脉综合征和中风的斑块破裂和内皮损伤的不稳定动脉粥样硬化的病人亚组的相关体内模型。

[0142] 根据扫描电子显微术的评估，持续紧扎颈动脉 5 分钟导致内皮细胞层完全丧失并引发血小板在损伤部位粘附（附图 1a）。体内荧光显微术可用于直接将血管损伤后的血小板聚集的动力过程可视化并定量。内皮剥落后的最初几分钟无数血小板粘连至血管壁（ $4620 \pm 205$  血小板/ $\text{mm}^2$ ）。事实上所有与内皮下层建立联系的血小板最初都表现“停止-启动”型的缓慢表面易位 (Savage, B., Saldivar, E. & Ruggeri, Z. M. Initiation of platelet adhesion by arrest on fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996 ;84, 289-297)。而我们在 88% 的全部血小板中观察到从最初的缓慢表面易位向不可逆血小板粘附的转变（ $4182 \pm 253$  血小板/ $\text{mm}^2$ ）（附图 1b），只在 12% 中保持瞬间的血小板捕获（ $543 \pm 32$  血小板/ $\text{mm}^2$ ）。一旦建立了稳定的捕获，附着的小血小板就从血循环中招募另外的血小板，导致凝集形成（附图 1c）。用固定化的胶原蛋白在体外获得了与血小板募集相似的特征。相反，生理条件下仅有极少血小板被粘连到完整血管壁（ $P < 0.05$  vs. 血管损伤），而且实际上 100% 的这些血小板都从这些血管壁转移而未产生稳定捕获（ $P < 0.05$  vs. 血管损伤，附图 1a-c）。

#### [0143] 将 GPVI 鉴定为体内血管损伤的血小板中的新型相关靶蛋白

[0144] 涉及种种不同受体和信号途径的血小板-血管壁互作的高度复杂性使得难于体内抑制这一过程。除了经 von Willebrand 因子 (vWF) 与胶原蛋白间接互作的 GPIIb-V-III<sub>b</sub> 和  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  整合素之外，已经在血小板上鉴定了大量胶原蛋白受体，包括最重要的  $\alpha_2\beta_1$  整合素 (Santoro, S. A. Identification of a 160,000 dalton platelet membraneprotein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell* 1986 ;46, 913-920)、GPV (Moog, S. 等人, Platelet glycoprotein VI V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood* 2001 ;98, 1038-1046)、和 GPVI (Moroi M., Jung, S. M., Okuma, M. & Shinmyozu, K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin. Invest* 84, 1440-1445)。在几份关于在体外起作用的不同信号系统的报告中，现在也已经讨论了 GPVI (Gibbins, J. M., Okuma, M., Farndale, R., Barnes, M. & Watson, S. P. glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the

Fc receptor gamma-chain. FEBS Lett. 1997 ;413, 255-259 ;Nieswandt, B. 等人, Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001 ;193, 459-469, Nieswandt, B. 等人, Glycoprotein VI but not  $\alpha_2\beta_1$  integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001 ;20, 2120-2130)。

[0145] 为直接测试血小板-胶原蛋白互作在动脉血栓形成中的体内相关性,我们在体内抑制或缺失了 GPVI。单克隆抗体 (mAb) JAQ1 阻断小鼠 GPVI 上的主要胶原蛋白结合位点 (Schulte, V. 等人, Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. J Biol. Chem. 2001 ;276, 364-368), 并在高剪切流条件下几乎完全抑制血小板向固定化纤维状胶原蛋白的稳定粘附 (Nieswandt, B. 等人, glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J 2001 ;20, 2120-2130)。为研究 GPVI-胶原蛋白互作在动脉血栓形成中的血小板粘附/凝集动力学过程中的重要性,使小鼠接受用 JAQ1 Fab 片段或同型匹配的对照 IgG 预孵育的同源、荧光标记血小板,并如上述诱导颈动脉损伤。非常出人意料的是,我们发现对 GPVI 的抑制使正常颈动脉内皮剥落后的初始血小板粘连减少了 89% ( $P < 0.05$  vs. 对照 IgG, 附图 2a), 这一过程被认为主要由 GPIb  $\alpha$  与固定的 vWF 间的互作所介导 (Goto, S., Ikeda, Y., Saldivar, E. & Ruggeri, Z. M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. J. Clin. Invest. 1998 ;101, 479-486 ;Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Banga, J. D., Nieuwenhuls, H. K. & de Groot, P. G. Platelet adhesion. Semin. Hematol. 1995 ;32, 89-98)。此外, JAQ1 使稳定的血小板捕获减少了 93% (附图 2a)。我们只在 58% 的那些已与内皮下层建立初始接触的血小板中观察到从最初的粘连/缓慢表面易位向不可逆血小板粘附的转变 (与用对照 IgG 预处理的血小板的 89% 相比,  $P < 0.05$ , 附图 2b)。用 JAQ1 Fab 片段预处理血小板后基本上未见附着血小板的凝集,但在对照中不是这样 ( $P < 0.05$  vs. 对照, 附图 2c 和 d)。这些资料证明,直接的血小板-胶原蛋白互作对于在血管损伤部位的初始血小板粘连和之后的稳定血小板粘附和凝集是关键。此外,这些发现显示, GPVI 是这一过程中的关键调节因子,而其它表面受体,最重要的 GPIb-V-IX 和  $\alpha_2\beta_1$ , 在体内不足以在内皮下层上引发血小板粘附和凝集。

[0146] 为了排除该效应是以其它受体,例如 GPIb-V-IX, 通过表面结合的 JAQ1 形成的空间损害为基础的这一可能性,我们通过在血管损伤前五天注射 JAQ1 产生了 GPVI-缺陷型小鼠。正如之前的报道,这样的处理基本上导致 GPVI 的完全丧失,例如通过循环血小板上的 GPVI 的内化和蛋白酶降解,从而产生与“GPVI 敲除”类似的表型至少两个星期 (Nieswandt, B. 等人, Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001 ;193, 459-469)。如附图 3a 中所示例的,注射 100  $\mu$ g/小鼠的 JAQ1 后第五天在来自经 JAQ1 处理的小鼠的血小板中检测不到 GPVI,但对对照 IgG 却不,尽管在两组小鼠中所有其它受测试受体,包括 GPIb-V-IX、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、和  $\alpha_2\beta_1$ , 的表面表达和功能都未改变,这证实了早些时候的结果 (数据未给出, Nieswandt, B. 等人, Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. J. Exp. Med. 2001 ;193, 459-469)。

[0147] 如扫描电子显微术所示,总颈动脉内皮剥落后的血小板粘附和凝集在 GPVI 缺陷小鼠中基本缺失,但在 IgG 预处理小鼠中却不(附图 3b)。接着,将体内视频荧光显微术用于定义 GPVI 缺陷小鼠中血管损伤后的血小板粘附动力学(附图 3c-f)。GPVI 的丧失使血小板在血管损伤处的粘连/缓慢表面易位显著减少(与 IgG 预处理的小鼠相比减少 83%,  $P < 0.05$ )。这一 GPVI 非依赖的缓慢表面易位需要 vWF-GPIb  $\alpha$  - 互作,因为将血小板与针对 GPIb  $\alpha$  的功能阻断型 mAb (p0p/B) 的 Fab 片段预孵育会将其取消,这证明 GPIb  $\alpha$  在这一过程中的关键作用(未显示)。GPVI 缺乏时,与对照(IgG-处理)相比,稳定的血小板粘附被降低约 90%,但是基本上不存在附着血小板的凝集(附图 3b-f)。我们仅在所有最初粘连至损伤位点的血小板的 58%中看到从血小板粘连到稳定血小板粘附的转变(与经对照 mAb- 预处理的血小板的 89%相比,  $P < 0.05$ ,附图 3d),指示 GPIb  $\alpha$  - 依赖性的表面易位不足以促进稳定的血小板粘附和之后的凝集。

[0148] GPVI 阻断对血小板粘连的具有深远意义的抑制是令人惊讶的,并暗示着这种受体在血小板向血管损伤稳定粘附的最初始阶段中具有之前未曾被识别的功能。纤维状胶原蛋白是人动脉粥样硬化损伤的主要组分(Rekhter, M. D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc. Res.* 1999 ;41, 376-384 ; Rekhter, M. D. 等人, Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am. J. Pathol.* 1993 ;143, 1634-1648); 被增强的胶原蛋白合成(通过内膜平滑肌细胞和成纤维细胞)在动脉粥样硬化形成过程中显著促进腔室变窄(Opsahl, W. P., DeLuca, D. J. & Ehrhart, L. A. Accelerated rates of collagen synthesis in atherosclerotic arteries quantified in vivo. *Arteriosclerosis* 1987 ; 7, 470-476)。斑块破裂和裂隙(自发发生的或在气囊血管形成术后发生的)导致胶原蛋白纤维暴露于血流。

[0149] 本发明首次教导这样的内皮下层胶原蛋白是动脉血栓形成的主要开关,并揭示了胶原蛋白受体 GPVI 在将血小板募集至受伤血管壁中的意料不到的功能。在提高的剪切力条件下的血小板粘连和缓慢表面易位过程已知大部分依赖于 GPIb  $\alpha$  与固定的 vWF 的互作。然而,由于还需要有功能的 GPVI,因此这一互作尚不足以在体内建立最初的血小板-血管壁互作(附图 2 和 3)。因此, GPIb  $\alpha$  和 GPVI 都必需共同作用以将血小板招募至内皮下层。在血小板粘连过程中, GPVI 的连接可将  $\alpha_{IIb}\beta_3$  和  $\alpha_2\beta_1$  整合素从低亲和力状态转变为高亲和力状态。 $\alpha_{IIb}\beta_3$  和  $\alpha_2\beta_1$  之后都共同作用以促进之后血小板在胶原蛋白上的稳定捕获,而  $\alpha_{IIb}\beta_3$  对于随后的附着血小板的凝集很重要。因此,在血小板和内皮下层胶原蛋白最初接触过程中的 GPVI 连接提供了对随后的稳定血小板粘附和凝集很重要的激活信号。重要的是, GPIb  $\alpha$  占位或在侧边聚集(在 GPIb  $\alpha$  - 依赖的表面易位过程中),其在体外诱导低水平的  $\alpha_{IIb}\beta_3$  整合素激活(Kasirer-Friede, A. 等人, Lateral clustering of platelet GPIb-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of Integrin IIb 3. *J. Biol. Chem.* 2002 ; Vol 277 :11949-11956),但在体内不足以促进血小板粘附。

[0150] 本发明因此已经鉴定了抑制血小板附着至内皮下层的重要受体。阻断 GPVI 与暴露的胶原蛋白相互作用的抗体能特异性抑制血栓形成的所有主要阶段,即,在动脉损伤部位的血小板粘连、稳定粘附、和凝集(例如在急性冠状动脉综合征过程中)。由对 GPVI 的抑

制或消耗而实现的这一意义重大的保护作用确立了对 GPVI- 胶原蛋白互作的选择性药理学调节以控制病理动脉粥样硬化损伤的发作和发展的重要性。

[0151] 动脉粥样硬化斑块破裂后,内皮下胶原蛋白的暴露是引发血小板在损伤位点粘附和凝集的主要开关,随后是动脉血栓形成(1;24;25)。最近已被克隆(5;6)的血小板糖蛋白 GPVI 已被本发明鉴定为主要的血小板胶原蛋白受体(4),其在体外(22)和体内(病理)生理条件下(3)都介导血小板粘附。因此,如本发明所示,通过特异性融合蛋白 Fc-GPVI-nt 对血小板粘附的体外和体内抑制活性,对 GPVI 的抑制会阻止患严重动脉粥样硬化的病人中血小板募集和动脉血栓的形成。

[0152] 用腺病毒表达系统在 HELA 细胞中表达 Fc-GPVI-nt 融合蛋白得到可溶性 Fc-GPVI-nt。GPVI 可溶形式的表征揭示,Fc-GPVI-nt 以分子量约为 160kDa 的二聚体分泌。相应地, Miura 和同事近来报道, GPVI-Fc- 二聚体以二聚体存在,其中两个 GPVI-Fc- 二聚体分子通过各分子 Fc 结构域中的 Cys 形成的二硫键交联(21)。重要的是,已经报道,只有 GPVI 的二聚体形式,而不是 GPVI 细胞外结构域单体,表现胶原蛋白结合亲和力并减弱胶原蛋白诱导的血小板凝集(21)。

[0153] 为定义 GPVI-Fc- 二聚体-胶原蛋白互作完成了结合检测。可溶性 GPVI 以可饱和方式与固定化的胶原蛋白结合。与纤维状胶原蛋白结合的 GPVI-Fc- 二聚体是高亲和性的,因为它对固定化的 vWF 或 BSA 不发生结合。此外,与固定化胶原蛋白结合的 GPVI 能被可溶性胶原蛋白抑制。需要高浓度的可溶胶原蛋白来阻断 GPVI-Fc- 二聚体结合,这指示融合蛋白以高亲和力与固定化的胶原蛋白结合。相应地,已经报道了 GPVI- 胶原蛋白互作的高结合和解离常数 ( $K_D$  约为  $5.8 \times 10^{-7}M$ ) (21)。

[0154] 较早时候已证实,可溶性 Fc-GPVI-nt 能减弱对以高亲和力与 GPVI 结合的胶原蛋白或 convulxin(蛇毒素)应答的血小板激活和凝集(6;21;27)。除了血小板凝集,GPVI 还关键地参与血小板对胶原蛋白的粘附过程(3;22)。因此,在本研究中我们体外测试了在生理流条件下 Fc-GPVI-nt 对血小板粘附的效应。我们显示,可溶性 Fc-GPVI-nt 在体外低和高剪切条件下以剂量依赖方式抑制血小板粘附。在 Fc-GPVI-nt 而非对照 Fc 肽存在下,基本上未出现附着血小板的凝集,表明 GPVI 通过固定化的胶原蛋白促成血小板粘附和之后的激活这两个过程。GPVI 以受体密度依赖方式进行胶原蛋白应答(即粘附和凝集)(22)。相应地,已经报道,如果转染 RBL-2H3 细胞的 GPVI 表达降低超过 50%,则这些细胞中缺乏由胶原蛋白诱导的凝集(8;22)。虽然由于已经报道了在小样本群体中 GPVI 受体密度的低可变性(22),仍然可以预计对胶原蛋白-GPVI 结合约 50%的抑制足以减弱血小板向已暴露胶原蛋白的募集。在本研究中,需要 1mg/kg Fc-GPVI-nt 的剂量来诱导流体条件下对血小板粘附的显著抑制,这支持在各胶原蛋白纤维中具有多个 GPVI 结合位点的想法。需要类似量的功能阻断型抗-GPVI 抗体来减弱体内血小板-血管壁损伤(3)。

[0155] 纤维状胶原蛋白是正常血管壁中,以及动脉粥样硬化损伤中的主要成分(28)。动脉粥样硬化斑块的破裂或裂隙导致胶原蛋白纤维暴露于循环血小板。如以前所报道的, GPVI- 胶原蛋白互作本质上参与血管损伤后的动脉血栓形成(3)。这里我们证实了动脉损伤后可溶性 Fc-GPVI-nt 对血小板募集的体内效应。内皮剥落由对该颈动脉的可逆扎紧诱导,根据描述的,血小板附着的动力学过程通过活体视频荧光显微术进行监视(3)。我们首次体内证实了,可溶性 Fc-GPVI-nt 减弱内皮剥落后的稳定血小板粘连、粘附和血小板凝

集。Fc-GPVI-nt 对血小板募集的抑制是剂量依赖型的。除了阻止血小板的稳定捕获之外，Fc-GPVI-nt 还显著降低在内皮剥落部位的初始血小板粘连 / 缓慢表面易位。我们早前已经证实，对 GPIIb 或 GPVI 的抑制以相似的程度减弱血小板粘连程度 (3)，这支持了 GPVI 和 GPIIb  $\alpha$  互作需要接触作用以促进血小板向内皮下胶原蛋白的粘连 (2 ;29-31)。实际上，已经报道的 GPVI- 配体互作的高结合解离率 (“on”-and “off”-rates) (22) 与 GPVI 作为粘连受体的作用是一致的。

[0156] 本发明将 Fc-GPVI-nt 鉴定为减弱血管损伤后动脉血栓形成的药物中的活性成分。这个概念得到用组织化学所证实的 Fc-GPVI-nt 靶向血管损伤部位的已暴露内皮下层这一观察结果的进一步支持。这暗示着，对 GPVI- 胶原蛋白互作的抑制可能被限制在血管损伤位点，而对血小板功能的延长的系统性抑制受到未结合 Fc-GPVI-nt 的预计的短半衰期的限制。相反，施用针对 GPVI 的单克隆抗体不可避免地导致对所有循环血小板上的 GPVI 的系统性抑制。而且，施用 Fc-GPVI-nt 并不影响血小板计数。相反，抗 -GPVI mAbs 可能最终导致免疫血小板减少症或循环血小板上 GPVI 完全丧失 (14 ;32)，从而妨碍它们在临床实践中的用途。因此，与以抗 -GPVI mAb 为基础的策略相比，Fc-GPVI-nt 疗法将可能具有较低的临床出血风险。

[0157] 血管损伤位点的血小板粘附和凝集对于止血是关键性的，但可能导致动脉粥样硬化环境下动脉阻塞以及例如冠状动脉血栓形成和心肌梗死这样的沉积性疾病。静脉内 GPIIb-IIIa 受体抑制剂的应用显著改善了进行冠状动脉支架术的病人的临床成功率 (33-35)。然而，已经报道严重的流血并发症妨碍了用阿昔单抗进行治疗的病人的成功率 (36)。本发明证实，Fc-GPVI-nt 对 GPVI- 胶原蛋白互作的抑制足以在体外和体内都显著降低血小板粘附；然而，GPVI 的可溶形式只适度延长尾部出血时间。类似地，在带有 GPVI 缺陷型血小板的病人中已经报道了中度的出血疾病 (37)，这指示甚至在完全缺失 GPVI 时凝固和止血也是有效的。这种差异可能部分由这一事实引起：对 GPVI 的抑制或缺失不干扰对胶原蛋白以外的血小板激动剂，例如 ADP、组织因子或凝血酶，应答而产生的血小板凝集。相反，对 GPIIb-IIIa 的直接抑制，例如通过 7E3 或其人源化衍生物，阻断了纤维蛋白原与血小板的结合——它是血小板凝集的关键过程，并显著减弱血小板对大多数目前已知的激动剂的凝集。因此，与以抗 -GPIIb-IIIa 为基础的策略相比，Fc-GPVI-nt 疗法将可能具有较低的临床出血风险。

[0158] 总之，本发明首先提供体内证明：在体外流式条件下以及在体内小鼠颈动脉中的内皮剥落后，Fc-GPVI-nt 减弱血小板粘附。这进一步支持了这一概念：GPVI- 胶原蛋白互作在血栓形成的所有阶段，即在动脉损伤（例如急性冠状动脉综合征）部位的血小板粘连、稳定粘附、和凝集，中都起着重要作用。本发明进一步支持这一概念：GPVI 在动脉粥样硬化进程中起重要作用。此外，本发明首次显示 GPVI 和糖尿病间的因果关系。

[0159] 参照以下特定实施例，本发明现将得到更进一步的详细描述。

[0160] 实施例

[0161] 动物。特定无病 C57BL6/J 小鼠来自 Charles River (Sulzfeld, Germany)。用 12 周龄的雄性小鼠进行试验。对动物进行的所有试验程序都已经过德国动物保护立法会 (German legislation on protection of animals) 批准。

[0162] 单克隆抗体。根据所述产生单克隆抗体 (mAb) 抗 GPVI (JAQ1) 和抗 GPIIb  $\alpha$  (p0p/

B) 和源自 JAQ 和 pOp/B 的 Fab 片段 (Bergmeier, W., Rackebrandt, K., Schroder, W., Zirngibl, H. & Nieswandt, B. Structural and functional characterization of the mouse vonWillebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. Blood 2000 ;95,886-893 ;Nieswandt, B., Bergmeier, W., Rackebrandt, K., Gessner, J.E. & Zirngibl, H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. Blood 2000 ;96, 2520-2527)。无关对照大鼠 IgG 获自 Pharmingen (Hamburg, Germany)。

[0163] GPVI- 缺陷型小鼠的产生。

[0164] 为产生缺失 GPVI 的小鼠,用 100  $\mu$ g JAQ1 i.c. 注射 C57BL6/J 野生型小鼠。注射 mAb 后第五天将动物用于血小板粘附体内评估。用 Western 印迹分析和流式细胞术核实血小板上 GPVI 表达的缺失。

[0165] 流式细胞术

[0166] 用改良 Tyrodes-HEPES 缓冲液 (134mM NaCl, 0.34mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.9mM KCl, 12mM  $\text{NaHCO}_3$ , 20mM HEPES, 5mM 葡萄糖, 和 1mM  $\text{MgCl}_2$ , pH6.6) 以 1 : 30 稀释获自野生型 C57BL6/J 小鼠或 GPVI- 清除型小鼠的肝素化全血。将样品与用荧光团标记的 mAb 抗 -GPVI (JAQ1) 和抗 -CD41 在室温下孵育 10 分钟,并直接在 FACScan™ (Becton Dickinson) 上进行分析。

[0167] 可溶性人和鼠 GPVI 的克隆、病毒表达和纯化。为产生人 GPVI 的可溶形式,根据下面实施例 1 至 3 对人 GPVI 细胞外结构域进行克隆并将其与人免疫球蛋白 Fc 结构域融合。制备编码 GPVI-Fc- 融合蛋白或对照 Fc 的腺病毒构建物以产生重组蛋白。用人 HELA 细胞系以分泌可溶形式表达 GPVI-Fc 和对照 Fc 以防止错误折叠和被表达蛋白的非糖基化。

[0168] 实施例 1:免疫粘附素 GPVI (Fc-GPVI-nt) 的克隆

[0169] 通过产生同时具有 GPVI n- 末端部分和 IgG Fc 部分的重组融合蛋白,我们构造了 GPVI 受体免疫粘附素,其中 GPVI n- 末端部分编码 GPVI 细胞外结构域。用正向引物 5' -cgcggggcggcccgaggt-ccaaatcttgtgacaaaac-3' 和反向引物 5' -gcgggaagctttcatttaccggagacagggag-3' 进行 PCR 从人心脏 cDNA 文库 (Clontech, Palo Alto, CA) 扩增得到 Fc。用 Expand HighFidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 在 58°C 退火温度下进行 20 循环以完成 PCR 反应。将 PCR 片段克隆进带有 NotI/HindIII 的质粒 pADTrack CMV,并通过测序对序列进行核查 (MediGenomix, Martinsried, Germany)。

[0170] 为克隆人 GPVI 细胞外结构域,根据制造商的程序从培养的巨核细胞分离 RNA (RNeasy Mini 试剂盒 ;Qiagen, Hilden, Germany),并用 2  $\mu$ g RNA 在 37°C 过夜完成反转录 (Omniscript RT 试剂盒 ;Qiagen)。将 100ng 反应物用做模板,用引物 5' -cgcggggcggcccgaggt-ccaaatcttgtgacaaaac-3' 和 5' -cgcggggcggcccgaggt-ccaaatcttgtgacaaaac-3' 进行 hGPVI 的 PCR 扩增反应。用 Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 在 54°C 退火温度下进行 24 循环以完成 PCR 反应。将 PCR 片段克隆进带有 BgIII/NotI 的质粒 pADTrackCMV,并通过测序对序列进行核查。

[0171] 基于 Fc-GPVI-nt 的单体融合蛋白的构建

[0172] 用引物对 5' -cgcggggcggcccgaggt-ccaaatcttgtgacaaaac-3' 和 5' -cgcggggcggcccgaggt-ccaaatcttgtgacaaaac-3' 和模板 pADTrack CMVgpVI-Fc, PCR 扩增 Fc 单体片段。用 Expand

High Fidelity PCR System(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 在 58℃ 退火温度下进行 20 循环以完成 PCR 反应。如上所述克隆 Fc 单体 PCR 片段 (NotI/EcoRV) 和来自 pADTrack CMV gpVI-Fc(BglIII/NotI) 的 gpVI 片段。

[0173] 实施例 2 :产生 Fc-GPVI-nt 的腺病毒 (Ad-Fc-GPVI-nt)

[0174] 质粒 pADTrack CMV Fc-GPVI-nt 用 PmeI(New England Biolabs, Beverly, MA) 线性化过夜,去磷酸化并纯化 (GFX DNA and GelPurification Kit ;Amersham Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)。为进行重组,用 1 μ g 线性化的质粒和 0.1 μ g pAdeasy1 共转化电感受态大肠杆菌 BJ5183(Stratagene, La Jolla, California),转化条件为 2500V,200 Ω 和 25 μ FD(E. coli-pulser ;Biorad,Heidelberg,Germany),铺平板并于 37℃ 培养过夜。微量制备带有 PacI 的质粒 -DNA 后核查克隆,并将阳性克隆重新转化进大肠杆菌 DH5 α。

[0175] 为转染 (Effectene Transfection reagent ;Qiagen,Hilden,Germany) 293 细胞,用 PacI 消化质粒 -DNA。细胞培养 7 天,通过刮取收集并离心。将离心物重悬于 Dulbecco's PBS 中,并经四次反复冻 (-80℃) 融 (37℃) 循环将细胞裂解。离心除去细胞碎片,裂解物保存于 -80℃。

[0176] 为重组病毒的斑点选择,室温下将 293 细胞在含有不同稀释倍数转染裂解物的 Dulbeccos PBS 中轻轻搅动感染 1 小时。感染后,用含 0.5% 琼脂糖的生长培养基 (改良 Eagles 培养基 2× 和 Gibco LifeTechnologies #21935 的 1 : 1 混合物,补加了 20% 血清、2× 青霉素 / 链霉素、2×L- 谷胺酰胺和溶于水中的 1% 琼脂糖,Seacam) 覆盖细胞。感染后 5 ~ 14 天,监视细胞层斑块的形成,用巴斯德吸管挑取斑块,重悬于 0.5ml Dulbeccos PBS,并保存于 -80℃。斑块进一步用于在 293 细胞上的扩增循环。

[0177] 表达稳定 CHO 的人 gpVI-Fc 单体的构建

[0178] 根据实施例 2 产生表达单体的细胞。

[0179] 实施例 3 :Fc-GPVI-nt 蛋白质和 Fc 对照免疫粘附素的纯化

[0180] 感染后 2 天收集 Ad-Fc-GPVI-nt- 感染的 HeLa 细胞培养物上清液,离心 (3800g,30 分钟,4℃) 并过滤 (0.45 μ m)。加入 1 倍体积的硫酸铵 (761g/l) 使免疫粘附素沉淀,4℃ 搅拌过夜。离心 (3000g,30 分钟,4℃) 使蛋白质成团,溶于 0.1 倍体积的 PBS,并在 PBS 中 4℃ 透析过夜。离心 (3000g,30 分钟,4℃) 使蛋白质溶液澄清,并将其上载至蛋白质 A 柱 (HiTrap™ protein A HP, Amersham PharmaciaBiotech AB, Uppsala, Sweden)。用结合缓冲液 (20mM 磷酸钠缓冲液 pH7.0,0.02% Na<sub>3</sub>) 洗涤柱直至 OD<sub>280</sub> < 0.01,并用洗脱缓冲液 (100mM 甘氨酸 pH2.7) 洗脱。用中和缓冲液 (1M Tris/HCl pH9.0,0.02% Na<sub>3</sub>) 中和洗脱的级分,收集,在 PBS 中 4℃ 透析过夜,等量分装并冷冻于 -20℃。

[0181] 根据考马斯蓝染色、或用过氧化物酶缀合的山羊抗 - 人 Fc 抗体或抗 -GPVI mAb 5C4 做的免疫印迹检测,Fc-GPVI-nt 蛋白在 SDS-PAGE 中的还原条件下分子量为 ~ 80kDa (附图 1a,上图和中图)。相反,在非还原条件下鉴定到了 ~ 160kDa 的蛋白质 (附图 1a,下图),这支持了这一想法 :GPVI-Fc 仅以二聚体形式获得 (21)。

[0182] 实施例 4 :GPVI 抑制剂筛选检测试验

[0183] 在 100 μ l 50mM Tris/HCl pH8.0 中,用 1 μ g/ 孔胶原蛋白 (I 型,牛 ;BD Bioscience, Bedford, MA) 于 4℃ 包被 ELISA 板 (Immulon2HB, Dynx Technologies, Chantilly, VA) 过夜。将板用 250 μ l/ 孔 PBS/0.05% Tween 20 (PBST) 洗涤两次,并用

250  $\mu$  l/孔 Roti-Block (Roth, Karlsruhe, Germany) 封闭过夜。将板用 250  $\mu$  l/孔 PBST 洗涤两次。加入 100  $\mu$  l 溶于 PBST 中的 Fc-GPVI-nt (理想的是 2  $\mu$  g/孔), 并将板在室温下孵育 1 小时。用 250  $\mu$  l PBST 洗涤五次后, 加入 100  $\mu$  l 以 1 : 10000 稀释的过氧化物酶缀合的山羊抗-人 IgG 抗体 (Dianova, Hamburg, Germany), 于室温下孵育 1 小时。用 250  $\mu$  l PBST 重复洗涤后, 加入 100  $\mu$  l 检测试剂 (BM Blue POD Substrate ;Roche, Mannheim, Germany), 并孵育 15 分钟。加入 100  $\mu$  l 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使反应终止, 于 450nm 处测定板, 对照波长为 690nm。为筛选潜在的抑制剂, 将测试化合物以不同浓度加到 100  $\mu$  l PBST 孵育物中。

[0184] 实施例 5 :血小板凝集和发光测定

[0185] 用两通道 Chronolog 凝集测定计 (Nobis, Germany) 于 37°C 在柠檬酸化血液样品中通过光学凝集测定来评估离体或体外血小板凝集。通过离心 (200g, 20 分钟) 从柠檬酸化的全血制备血小板富集的血浆。用自体同源血浆将最终的血小板计数调节至  $2 \times 10^8$  血小板 /ml。基线调节后, 加入 0.2 至 4  $\mu$  g/ml 的胶原蛋白 (I 型, 牛), 记录凝集 5 分钟。同时, 用萤火虫发光测定法记录 ATP 释放。用 50  $\mu$  g/ml 单克隆 GPVI 抗体 JAQ1 孵育 15 分钟。

[0186] 实施例 6 :GPVI/ 胶原蛋白互作的体外血小板粘附试验

[0187] 从 ACD (20% 终浓度) 血液制备血小板富集的血浆, 并用 HEPES Tyrode (pH 6.5) 将其调节至终浓度  $10^8$  血小板 /ml。盖玻片用不同浓度的各种粘附蛋白 (胶原蛋白、vWF) 单层包被。在产生自玻璃盖玻片的灌注室中完成灌注研究。在代表低介质流的 500/s 剪切速率下和代表高剪切速率的 2000/s 下完成灌注。37°C 下测定粘附 20 分钟, 之后用自动注射器泵在固定的壁剪切速率下抽室 5 分钟。灌注后用 HEPES Tyrode 轻轻洗涤从室中取出的盖玻片。用 HEPES Tyrode 反复洗涤盖玻片直至完全去除粘附的血小板。用 FACS 测定法定量分析悬浮血小板。根据标准流式细胞程序通过分析表面标记 (CD41 ;CD61 和 CD62P) 的表达对血小板功能状态的分析作进一步评估。

[0188] 实施例 7 :为活体显微检查制备血小板

[0189] 血小板 (野生型, 或 GPVI- 缺陷型) 分离自所述的 (Massberg, S. 等人, Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. Blood 1998 ;92, 507-515) 全血, 并用 5- 羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (DCF)。将 DCF- 标记的血小板悬浮液调节至终浓度  $200 \times 10^6$  血小板 /250  $\mu$  l。在指明的地方, 用 50  $\mu$  g/ml 抗 -GPVI (JAQ1) Fab 片段、或抗 GPIIb  $\alpha$  (p0p/B) Fab 片段将荧光野生型血小板预孵育 10 分钟。之后, 将经过预处理的血小板和 Fab 片段一起注入野生型受体小鼠, 颈动脉损伤前或后用体内视频显微术评估血小板粘附, 如下述。

[0190] 实施例 8 :通过活体显微术估测血小板粘附和凝集。

[0191] 腹膜内注射咪达唑仑 (5mg/kg 体重, Ratiopharm, Ulm, Germany)、美托咪定 (0.5mg/kg 体重, Pfizer, Karlsruhe, Germany)、和芬太尼 (0.05mg/kg 体重, CuraMed Pharma GmbH, Munich, Germany) 溶液麻醉野生型 C57BL6/J 或 GPVI- 缺陷型小鼠。将聚乙烯导管 (Portex, Hythe, England) 植入右颈静脉, 并经静脉内注入荧光血小板 ( $200 \times 10^6$ /250  $\mu$  l)。将右总颈 7 动脉分离出来, 并在颈动脉二分叉处紧扎 5 分钟, 以诱导血管损伤。血管损伤之前及之后借助对右总颈动脉的体内视频显微术将荧光血小板原位可视化。用带 100W HBO 水银灯落射显微镜灯的 Zeiss Axiotech 显微镜 (20 $\times$  水浸物镜, W20 $\times$ /0.5, Zeiss) 监视血小板 - 血管壁互作。用计算机辅助图像分析程序 (Cap Image 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg,

Germany) 评估所有视频记录的图像。将瞬间附着的血小板定义为以显著低于中线速度的速度穿过血管假想垂直线的细胞；它们的数量以每  $\text{mm}^2$  内皮表面的细胞数表示。通过 10 秒钟内未移动或未从内皮表面脱离的细胞进行计数来估算附着的血小板数量。还定量了在血管损伤处凝集的血小板数量，并以每  $\text{mm}^2$  表示。

[0192] 实施例 9 :扫描电子显微术。

[0193] 活体视频荧光显微术后，用 PBS (37°C) 灌注颈动脉 1 分钟，之后用磷酸缓冲的戊二醛 (1% vol/vol) 灌注固定。将颈动脉切离，纵向切开，浸没在 1% PBS- 缓冲的戊二醛中进一步固定 12 小时，在乙醇中脱水，并用  $\text{CO}_2$  做临界点干燥处理。之后，将颈动脉样本内腔暴露定向，用碳染料封固，喷铂包被，并用场发射扫描电子显微镜 (JSM-6300F, Jeol Ltd., Tokyo, Japan) 检查。

[0194] 实施例 10 :对与固定化胶原蛋白结合的 Fc-GPVI-nt 的评估。检测 Fc-GPVI-nt 与固定化胶原蛋白的结合。用  $1 \mu\text{g}$  胶原蛋白 (I 型, 牛 ;BD Bioscience, Bedford, MA) 在  $100 \mu\text{l}$  包被缓冲液 (1.59g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0.2g/l  $\text{NaN}_3$ , pH9.6) 中将 ELISA 板 (Immulon2HB, Dynx Technologies, Chantilly, VA) 在 4°C 包被过夜。板用  $250 \mu\text{l}$ /孔 PBS/0.05% Tween 20 (PBST) 洗涤两次，并用  $250 \mu\text{l}$ /孔 Roti-Block (Roth, Karlsruhe, Germany) 封闭过夜。板用  $250 \mu\text{l}$ /孔 PBST 洗涤两次，之后添加 3.0、6.0、12.5、25.0、50.0 或  $100 \mu\text{g/ml}$  溶于 PBST 的 Fc-GPVI-nt，室温下将板孵育 1 小时。在指明的地方，Fc-GPVI-nt ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) 与可溶性胶原蛋白预孵育 10 分钟。孵育后将板用  $250 \mu\text{l}$  PBST 洗涤五次，并以 1 : 10000 稀释加入特异性的过氧化物酶缀合的山羊抗-人 IgG 抗体 Fc  $\gamma$  片段 (109-035-098 ;Dianova, Hamburg, Germany)，室温下孵育一小时。用  $250 \mu\text{l}$  PBST 洗涤五次后，加入  $100 \mu\text{l}$  探测试剂 (BM Blue POD Substrate ;Roche, Mannheim, Germany)，孵育至 10 分钟。加入  $100 \mu\text{l}$  1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  使反应终止，在 450nm 处测定板，参照波长为 690nm。

[0195] Fc-GPVI-nt 与固定化胶原蛋白的结合表现剂量依赖和可饱和方式 (附图 9b)。在  $6.0 \mu\text{g/ml}$  的 Fc-GPVI-nt 终浓度处观察到半最大胶原蛋白结合。GPVI-Fc 未出现对 BSA、vWF (附图 9c, 左图) 或 Poly-L-Lysin (未显示) 的结合，这支持了 Fc-GPVI-nt 结合的特异性。此外，在相同条件下我们未探测到缺少外部 GPVI 结构域的对照 Fc 结构域的显著结合 (附图 9c, 右图)。

[0196] 为进一步说明 GPVI- 结合的特异性，我们测试了可溶性纤维状胶原蛋白与固定化胶原蛋白竞争结合 Fc-GPVI-nt 的能力。可溶性胶原蛋白以剂量依赖方式抑制 Fc-GPVI-nt 与固定化胶原蛋白的结合 (附图 9d)。将 Fc-GPVI-nt 结合降低超过 50% 需要浓度为  $100 \mu\text{g/ml}$  的可溶胶原蛋白。这些资料共同表明，Fc-GPVI-nt 与胶原蛋白的结合是特异性的，而且是以高亲和力为特征的。

[0197] 实施例 11 :针对人 GPVI 的单克隆抗体的产生。基本根据 (17) 所述产生单克隆抗体。用腺病毒表达的人 Fc-GPVI-nt 融合蛋白免疫 Lou/C 大鼠。用 Fc-GPVI-nt 或 GPVI 结构域缺失的 Fc 在固相免疫检测中筛选杂交瘤上清液。筛选鉴定了与 Fc-GPVI-nt 特异性结合但不与缺失外部 GPVI 结构域的 Fc 结合的杂交瘤 5C4 上清液。用大鼠 Ig 类别 (抗-IgM) 和 IgG 亚类特异性小鼠 mAbs 确定了免疫球蛋白类别。用蛋白质 G- 琼脂糖凝胶 (Protein G-Sepharose) 柱纯化单克隆抗体。通过针对 Fc-GPVI-nt 和对照 Fc 的免疫印迹核实了 5C4 的抗体特异性。5C4 单克隆抗体探测到腺病毒表达的 Fc-GPVI-nt，但不探测对照 Fc。此外，

从获自人的血小板的裂解液中回收人 GPVI。此外,如流式细胞术所证实的,5C4 特异性与血小板表面结合,而不与白细胞或红细胞结合(未显示)。

[0198] 实施例 12:对 CD62P 外化的 FACS 测定。从志愿者收集人柠檬酸盐血液。2000rpm 4°C 离心洗涤 (PBS 1×; pH7.2) 并重悬之后产生血小板富集的血浆 (PRP)。将稀释于含有 0.1% 叠氮化钠和 2% 胎牛血清 (FBS)、2mM  $\text{CaCl}_2$  的染色缓冲液 (1×PBS(w/o  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{+}$ ) 中的 PRP, 在 Fc-GPVI-nt (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 或等摩尔浓度对照 Fc 存在下, 与马 1 型胶原蛋白孵育 (0; 2; 5 和 10  $\mu\text{g/ml}$ ; Nobis)。加入用荧光团过氧化物酶标记的抗 CD62P 抗体 (Immunotech)。用 BectonDickenson FACScalibur 装置完成 FACS 测定。

[0199] 根据 CD62P 外化的指示, 提高的胶原蛋白浓度导致血小板从  $\alpha$  颗粒分泌。根据 FACS 所检测的, 胶原蛋白与 Fc-GPVI-nt 的共孵育使 CD62P 的外化钝化 (附图 10)。

[0200] 实施例 13: 血小板凝集和 ATP 释放。如上述产生 PRP。在全血凝集测定计 (Whole-Blood-Aggregometer) 500VS (Chrono-Log Corporation) 中测定凝集。用 Thyrodes-HEPES 缓冲液 (2.5mmol/l HEPES, 150mmol/l NaCl, 12mmol/l  $\text{NaHCO}_3$ , 2.5mmol/l KCl, 1mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 2mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 5.5mmol D-Glucose, 1mg/ml BSA, pH7.4) 将来自 PRP 的血小板细胞数调节至  $1.0 \times 10^8$  细胞 /ml。添加 Chrono-Lume #395 (Chrono-Log Corporation) 以进行 ATP 测定。将激动剂加入血小板, 吸入凝集测定计中, 在所定义的搅拌条件下开始凝集。根据由于血小板凝集而发生的光传播改变来测定凝集, 并将其标准化成内部标准。在 Chrono-Lume 的 ATP 特征波长处测定 ATP 释放, 并根据制造商的说明将其标准化成内部标准。

[0201] Fc-GPVI-nt 特异性抑制由胶原蛋白介导的激动剂刺激 (附图 11a & b) 引起的血小板凝集和 ATP 释放。ADP- 和凝血酶 - 介导的 (TRAP 10  $\mu\text{M}$ ) 血小板凝集和 ATP 释放不受 Fc-GPVI-nt 的影响。

[0202] 实施例 14: 人血小板的 PDGF 释放。如上所述制备来自人志愿者的 PRP。根据制造商的说明用试剂盒系统 (R&D Systems #DHD00B) 测定 PDGF 从人血小板的释放。在对照条件和 Fc-GPVI-nt (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 或等摩尔浓度对照 Fc 存在下用 1 型胶原蛋白 (20  $\mu\text{g/ml}$ ; Nobis) 刺激 PDGF 释放。将 PDGF 释放标准化为制造商的标准探针。

[0203] 作为内源递质从血小板  $\alpha$  颗粒释放的指示的 PDGF 释放在胶原蛋白刺激后也被钝化 (Fig 11c)。

[0204] 实施例 15: Fc-GPVI-nt 体外对人全血流时间的效应。用 PFA-100 装置 (Dade-Behring) 测定体外流血时间。将 800  $\mu\text{l}$  人全血注入 PFA-100 装置。根据制造商的说明, 用经 ADP/ 胶原蛋白和肾上腺素 / 胶原蛋白包被的测定细胞来测定流血时间。

[0205] 不同激动剂刺激后, 浓度升高的 Fc-GPVI-nt 未显著延长体外 (PFA-100 装置) 流血时间。相反, 治疗相关浓度的 ReoPro 在 PFA-100 装置中最大程度地延长了流血时间 (Fig 12)

[0206] 实施例 16: 流式条件下可溶性 GPVI 对血小板粘附于固定化胶原蛋白的效果。如 (18) 所述, 人血小板分离自 ADC- 抗凝全血。将洗涤过的血小板重悬于 Tyrodes-HEPES 缓冲液 (2.5mmol/l HEPES, 150mmol/l NaCl, 12mmol/l  $\text{NaHCO}_3$ , 2.5mmol/l KCl, 1mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 2mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 5.5mmol D-Glucose, 1mg/ml BSA, pH7.4) 以获得  $2 \times 10^8$  细胞 /ml 的血小板计数。在 200  $\mu\text{g/ml}$  Fc-GPVI-nt 或对照 Fc 存在下在平行板流式腔中测定血小板对经固定化胶原蛋白包被的板的粘附。

[0207] GPVI 在体外血小板向固定化胶原蛋白的募集过程中起重要作用 (22)。我们在体外测定了剪切条件下 Fc-GPVI-nt 对人血小板向固定化胶原蛋白粘附的效果。正如他人在早前的报道 (23) 中所述,血小板在低 (500 秒<sup>-1</sup>) 或高 (1000 秒<sup>-1</sup>) 剪切速率下都稳定粘附于固定化胶原蛋白而形成血栓 (附图 13)。可溶性 Fc-GPVI-nt,而非缺乏外部 GPVI 结构域的对照 Fc,在剪切速率 500 秒<sup>-1</sup> 和 1000 秒<sup>-1</sup> 时分别将血小板向固定化胶原蛋白的粘附显著减弱 37 和 44% (附图 13)。抑制是特异性的,因为 Fc-GPVI-nt 不影响血小板向固定化 vWF 的粘附。

[0208] 实施例 17 :Fc-GPVI-nt 血浆浓度的测定用定量测定人 IgG 的 IMMUNO-TEK ELISA 系统 (ZeptoMetrix Corporation ;Cat #0801182) 来完成。使用了针对 Fc-GPVI-nt 的 Fc 部分的特异性过氧化物酶缀合的山羊抗人 IgG 抗体 (Dianova)。根据制造商的说明书在用 PBS-T 进行的几个洗涤步骤之后,加入过氧化物酶底物 (BM Blue POD, Roche),并在 ELISA 检测读取器 (Tecan Sunrise) 中于 450 特征性 nm 波长处进行测定。通过与内部人 IgG 标准进行比较对 Fc-GPVI-nt 浓度进行定量。Fc-GPVI-nt 在体内显示令人满意的药物代谢动力学。小鼠腹膜内单次注射后 24 小时可以测得高血浆水平,融合蛋白的半衰期超过 96 小时 (附图 14a)。重复腹膜内注射导致融合蛋白在血液中聚集 (附图 14b),这暗示着长期应用于慢性疾病治疗的令人满意的动力学。以提高的剂量单次静脉内注射 Fc-GPVI-nt 后,5 至 60 分钟直至 14 小时后可探测到剂量依赖型血浆 Fc-GPVI-nt 浓度 (附图 14c)。

[0209] 实施例 18 :为离体荧光显微术制备鼠血小板。如早前 (19) 报道的,鼠血小板分离自全血,并用 5-羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (DCF) 标记。将 DCF 标记的血小板悬浮液调节至终浓度  $200 \times 10^6$  血小板 /250  $\mu$ l。如下述,颈动脉损伤之前和之后借助体内视频显微术评估鼠血小板粘附。

[0210] 实施例 19 :颈动脉紧扎以及借助活体显微术所作的血小板粘附和凝集评估。如早前 (3) 所报道的,完成内皮剥落后的血小板募集。简言之,腹膜内注射咪达唑仑 (5mg/kg 体重, Ratiopharm, Ulm, Germany)、美托咪定 (0.5mg/kg 体重, Pfizer, Karlsruhe, Germany)、和芬太尼 (0.05mg/kg 体重, CuraMed Pharma GmbH, Munich, Germany) 溶液麻醉野生型 C57BL6/J 小鼠。在指明的地方,经静脉内注射 Fc-GPVI-nt (1 或 2mg/kg 体重) 或与 2mg/kg Fc-GPVI-nt 等摩尔量的对照 Fc。之后,通过在颈动脉二分叉附近紧扎 5 分钟诱导内皮脱落。诱导血管损伤后,经植入右侧颈静脉的聚乙烯导管 (Portex, Hythe, England) 静脉内注入荧光血小板 ( $200 \times 10^6$  /250  $\mu$ l)。借助带 100WHB0 水银灯落射显微镜灯的 Zeiss Axiotech 显微镜 (20 $\times$  水浸物镜, W20 $\times$  /0.5, Zeiss) 通过对右侧颈总动脉的体内视频显微术将荧光血小板原位可视化。用计算机辅助图像分析程序 (Cap Image 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany (19 ;20)) 评估所有视频记录的图像。将粘连的血小板定义为所有与血管壁建立初始接触、之后缓慢表面易位 (以显著低于中线速度的速度) 或稳定粘附的细胞 ;它们的数量以每 mm<sup>2</sup> 内皮表面的细胞数表示。通过对 10 秒钟内未移动或未从内皮表面脱离的细胞进行计数来估算附着血小板的数量。还定量了在血管损伤处凝集的血小板数量,并以每 mm<sup>2</sup> 表示。此外,还用 Cap Image 7.4 评估了总血栓面积。

[0211] 实施例 20 :扫描电子显微术。活体视频荧光显微术后,用 PBS (37 $^{\circ}$ C) 灌注各组三只动物颈动脉一分钟,之后用磷酸缓冲的戊二醛 (1% vol/vol) 灌注固定。切出颈动脉,纵向切开,浸没在 1% PBS- 缓冲的戊二醛中进一步固定 12 小时,在乙醇中脱水,并用 CO<sub>2</sub> 做临

界点干燥处理。之后,将颈动脉样本内腔暴露定向,用碳染料封固,喷铂包被,并用场发射扫描电子显微术检查(JSM-6300F, Jeol Ltd., Tokyo, Japan)。

[0212] 实施例 21:通过免疫组织化学对体内 Fc-GPVI-nt 结合的评估。将经过 Fc-GPVI-nt 处理的小鼠颈动脉快速冷冻并包埋入 cryoblock(medite, Medizintechnik GmbH, Burgdorf, Germany)。在经特异性过氧化物酶缀合的山羊抗-人 IgG 抗体 Fc  $\gamma$  片段染色的 5  $\mu$ m 低温保持切片上测定 Fc-GPVI-nt 对内皮和内皮下层的结合(109-035-098; Dianova, Hamburg, Germany)。将获自经 Fc 处理的小鼠的颈动脉作为对照。

[0213] 实施例 22:可溶性 GPVI 对体内血小板计数、流血时间和血小板粘附的影响。

[0214] 用 2mg/kg 或 4mg/kg Fc-GPVI-nt 或等摩尔剂量的缺失外部 GPVI 结构域的对照 Fc 处理动物。甚至以最高剂量 4mg/kg 注入 Fc-GPVI-nt 或对照 Fc 也未显著影响外周血小板计数。此外,与对照动物相比, Fc-GPVI-nt 融合蛋白未诱导出任何尾部出血时间的显著延长(附图 15a)。用 PBS 处理的小鼠的绝对出血时间是  $1.9 \pm 0.9$ , 用 2mg/kg 或 4mg/kg Fc-GPVI-nt 处理的小鼠中绝对出血时间为  $2.9 \pm 1.9$  分钟和  $4.6 \pm 0.6$  分钟。相反,在经 Integrilin(0.2mg 每 kg IV) 处理的动物中,出血时间被大大延长( $42.6 \pm 21.6$ )。

[0215] 小鼠颈动脉损伤模型中 Fc-GPVI-nt 对血小板募集的影响可以用活体荧光显微术进行研究。如上所述,用 1mg/kg 或 2mg/kg Fc-GPVI-nt 或等摩尔量缺少外部 GPVI 结构域的对照 Fc 处理小鼠。注入 Fc-GPVI-nt 或对照 Fc 后,如之前(3)报道的,通过紧扎诱导小鼠颈动脉内皮脱落。持续结扎颈动脉导致内皮细胞层的完全脱落。借助体内荧光显微术将血小板粘附直接可视化并定量(19;20)(附图 15d)。在对照(经 Fc 处理的)小鼠中,在内皮脱落后最初的几分钟内无数血小板粘连至血管壁( $12.026 \pm 1.115$  粘连的血小板/ $\text{mm}^2$ )。与内皮下层建立接触的血小板最初表现缓慢的表面易位,表面易位后常常出现随后的血小板牢固粘附和凝集( $5.494 \pm 874$  附着的小血小板/ $\text{mm}^2$  和  $114 \pm 17$  血小板血栓/ $\text{mm}^2$ )。相反,在 Fc-GPVI-nt 存在下,血小板向血管损伤处的募集被剧烈减弱。与经 Fc- 处理的动物相比,用 1mg/kg 或 2mg/kg Fc-GPVI-nt 预处理后血小板粘连被降低 65 和 71% ( $P < 0.05$  vs. 对照)。同时,稳定血小板粘附以剂量依赖方式被降低(施用 1mg/kg 或 2mg/kg Fc-GPVI-nt 后分别降低 49 和 65%;  $P < 0.05$  vs. 对照)。同样,在经过 2mg/kg Fc-GPVI-nt 融合蛋白处理的动物中,基本上未出现附着血小板的凝集( $P < 0.05$  vs. 对照 Fc, 附图 15b-d)。扫描电子显微术还清楚地证实,在经 Fc-GPVI-nt 处理而非 FC 预处理的小鼠中,基本上未出现总颈动脉内皮脱落后的血小板粘附和凝集(附图 15e)。为了证实损伤位点处 Fc-GPVI-nt 的存在,体内显微术后将颈动脉切离,并用过氧化物酶缀合的山羊抗人 IgG 抗体进行免疫组织化学研究。在经 Fc-GPVI-nt- 处理的小鼠中,在血管损伤的腔面处检测到了 Fc-GPVI-nt(附图 15f)。这些资料共同证实了, Fc-GPVI-nt 特异性与体内血管损伤位点结合,并防止随后的血小板募集。

[0216] 可溶性 GPVI 对动脉粥样硬化的影响。四周龄 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠(The Jackson Laboratory) 饲用 0.25% 胆固醇饮食(Harlan Research diets) 六周。两周后,对四只 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠用 Fc-GPVI-nt(200  $\mu$ g 每只小鼠) 每周注射两次,同时继续胆固醇饮食。采用类似的方案对四只 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠注射对照 Fc 蛋白质(200  $\mu$ g) 每周两次,将它们用作对照小鼠。为评估斑块形成,将动物杀死,并从动物中仔细分离出血管树。整个主动脉和颈动脉标本用 0.9% 氯化钠冲洗并固定。完整的血管标本用 SUDAN III 红染色以评估斑块形成,并

在显微镜下观察。用 Fc-GPVI-nt 对易患动脉粥样硬化的 apoE<sup>-/-</sup> 敲除小鼠处理四周显著削弱动脉粥样硬化进程（附图 16）。

[0217] 实施例 23: 糖尿病患者血小板上的 CD61 和 CD32 表面表达的 FACS 测定。从 111 名患糖尿病的病人或 363 名非糖尿病患者收集人柠檬酸盐血液。4℃ 2000rpm 离心和洗涤程序 (PBS 1×, pH7.2) 并重悬后产生血小板富集的血浆 (PRP)。加入用荧光团过氧化物酶 (Immunotech) 标记的抗 CD61 和抗 CD32 抗体或 FITC 标记的抗单克隆抗-GPVI 抗体 4C9。用 Becton Dickenson FACScalibur 装置完成 FACS 测定。用荧光定量表面表达。计算 CD32 荧光和 4C9 荧光的相关性, 相关系数  $r = 0.516$ 。

[0218] 统计分析。用 Mann-Whitney Rank Sum Test 完成组平均值间的比较。数据代表平均值  $\pm$  s. e. m.。P < 0.05 的值视为显著。

[0219] 参考文献

[0220] 1. Baumgartner, H. R. 1977. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* 37:1-16.

[0221] 2. Clemetson, K. J. 和 Clemetson, J. M. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 86:189-197.

[0222] 3. Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., 和 Nieswandt, B. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J. Exp. Med.* 197:41-49.

[0223] 4. Moroi, M., Jung, S. M., Okuma, M., 和 Shinmyozu, K. 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin. Invest* 84:1440-1445.

[0224] 5. Clemetson, J. M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T. N., 和 Clemetson, K. J. 1999. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc $\alpha$ R and the natural killer receptors. *J Biol. Chem.* 274:29019-29024.

[0225] 6. Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A. H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J. P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C. 等人 2000. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96:1798-1807.

[0226] 7. Gibbins, J. M., Okuma, M., Farndale, R., Barnes, M., 和 Watson, S. P. 1997. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 413:255-259.

[0227] 8. Zheng, Y. M., Liu, C., Chen, H., Locke, D., Ryan, J. C., 和 Kahn, M. L. 2001. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma-chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol. Chem.* 276:12999-13006.

[0228] 9. Suzuki-Inoue, K., Tulasne, D., Shen, Y., Bori-Sanz, T., Inoue, O., Jung, S. M.,

Moroi, M., Andrews, R. K., Berndt, M. C., 和 Watson, S. P. 2002. Association of Fyn and Lyn with the prolinerich domain of GPVI regulates intracellular signalling. *J Biol. Chem.* .

[0229] 10. Barnes, M. J., Knight, C. G., 和 Farndale, R. W. 1998. The collagen-platelet interaction. *Curr. Opin. Hematol.* 5 :314-320.

[0230] 11. Falet, H., Barkalow, K. L., Pivniouk, V. I., Barnes, M. J., Geha, R. S., and Hartwig, J. H. 2000. Roles of SLP-76, phosphoinositide 3-kinase, 和 gelsolin in the platelet shape changes initiated by the collagen receptor GPVI/FcR gamma-chain complex. *Blood* 96 :3786-3792.

[0231] 12. Pasquet, J. M., Gross, B., Quek, L., Asazuma, N., Zhang, W., Sommers, C. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Judd, B., Lee, J. R. 等人 1999. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol. Cell Biol.* 19 :8326-8334.

[0232] 13. Berlanga, O., Tulasne, D., Bori, T., Snell, D. C., Miura, Y., Jung, S., Moroi, M., Frampton, J., 和 Watson, S. P. 2002. The Fc receptor gamma-chain is necessary 和 sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur. J. Biochem.* 269 :2951-2960.

[0233] 14. Sugiyama, T., Okuma, M., Ushikubi, F., Sensaki, S., Kanaji, K., 和 Uchino, H. 1987. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation 和 autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 69 :1712-1720.

[0234] 15. Sugiyama, T., Ishibashi, T., 和 Okuma, M. 1993. Functional role of the antigen recognized by an antiplatelet antibody specific for a putative collagen receptor in platelet-collagen interaction. *Int. J. Hematol.* 58 :99-104.

[0235] 16. Schulte, V., Snell, D., Bergmeier, W., Zirngibl, H., Watson, S. P., 和 Nieswandt, B. 2001. Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. *J Biol. Chem.* 276 :364-368.

[0236] 17. Kremmer, E., Kranz, B. R., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H. J., Delsol, G. 等人 1995. Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* 208 :336-342.

[0237] 18. Dickfeld, T., Lengyel, E., May, A. E., Massberg, S., Brand, K., Page, S., Thielen, C., Langenbrink, K., 和 Gawaz, M. 2001. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* 49 :189-199.

[0238] 19. Massberg, S., Enders, G., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Vestweber, D., Krombach, F., 和 Messmer, K. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92 :507-515.

- [0239] 20. Massberg, S., Enders, G., Matos, F. C., Tomic, L. I., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Messmer, K., 和 Krombach, F. 1999. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94 :3829-3838.
- [0240] 21. Miura, Y., Takahashi, T., Jung, S. M., 和 Moroi, M. 2002. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J. Biol. Chem.* 277 :46197-46204.
- [0241] 22. Chen, H., Locke, D., Liu, Y., Liu, C., 和 Kahn, M. L. 2002. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *J Biol. Chem.* 277 :3011-3019.
- [0242] 23. Savage, B., Almus-Jacobs, F., 和 Ruggeri, Z. M. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94 :657-666.
- [0243] 24. van Zanten, G. H., de Graaf, S., Slootweg, P. J., Heijnen, H. F., Connolly, T. M., de Groot, P. G., 和 Sixma, J. J. 1994. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin. Invest* 93 :615-632.
- [0244] 25. Baumgartner, H. R., Muggli, R., Tschopp, T. B., 和 Turitto, V. T. 1976. Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function. *Thromb. Haemost.* 35 :124-138.
- [0245] 27. Jandrot-Perrus, M., Lagrue, A. H., Okuma, M., 和 Bon, C. 1997. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol. Chem.* 272 :27035-27041.
- [0246] 28. Rekhter, M. D. 1999. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc. Res.* 41 :376-384.
- [0247] 29. Ruggeri, Z. M. 1997. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemost.* 78 :611-616.
- [0248] 30. Goto, S., Ikeda, Y., Saldivar, E., 和 Ruggeri, Z. M. 1998. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J. Clin. Invest.* 101 :479-486.
- [0249] 31. Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Banga, J. D., Nieuwenhuls, H. K., 和 de Groot, P. G. 1995. Platelet adhesion. *Semin. Hematol* 32 :89-98.
- [0250] 32. Nieswandt, B., Schulte, V., Bergmeier, W., Mokhtari-Nejad, R., Rackebrandt, K., Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Gachet, C., and Zirngibl, H. 2001. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 193 :459-469.
- [0251] 33. Lincoff, A. M., Califf, R. M., 和 Topol, E. J. 2000. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35 : 1103-1115.

- [0252] 34. Neumann, F. J. 和 Sch mig, A. 1998. Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with coronary stent placement. *Semin. Interv. Cardiol.* 3 :81-90.
- [0253] 35. Bertrand, M. E. , Rupprecht, H. J. , Urban, P. , Gershlick, A. H. , 和 Investigators, f. 2000. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102 :624-629.
- [0254] 36. Foster, R. H. 和 Wiseman, L. R. 1998. Abciximab. An updated review of its use in ischaemic heart disease. *Drugs* 56 :629-665.
- [0255] 37. Arai, M. , Yamamoto, N. , Moroi, M. , Akamatsu, N. , Fukutake, K. , 和 Tanoue, K. 1995. Platelets with 10 % of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br. J Haematol.* 89 :124-130.

[0001]

## 序列表

<110> ProCorde GmbH  
 <120> 含有糖蛋白VI结构域的免疫粘附素  
 <130> PCT-12286  
 <140> PCT/EP03/05929  
 <141> 2003-06-05  
 <150> EP 02 012 742  
 <151> 2002-06-07  
 <160> 9  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 504  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 融合蛋白  
 <400> 1  
 Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala  
 20 25 30  
 Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys  
 35 40 45  
 Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser  
 50 55 60  
 Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg  
 65 70 75 80

[0002]

Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp  
 85 90 95

Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala  
 100 105 110

Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly  
 115 120 125

Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala  
 130 135 140

Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp  
 145 150 155 160

Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly  
 165 170 175

Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser  
 180 185 190

Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr  
 195 200 205

Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser  
 210 215 220

Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr  
 225 230 235 240

Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser  
 245 250 255

Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Gly Gly Arg  
 260 265 270

Glu Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

[0003]

275	280	285
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro 290	295	300
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val 305	310	315 320
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val 325	330	335
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln 340	345	350
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln 355	360	365
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala 370	375	380
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro 385	390	395 400
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr 405	410	415
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser 420	425	430
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 435	440	445
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 450	455	460
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe 465	470	475 480

[0004]

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 500

<210> 2

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID No: 1的融合蛋白的DNA

<400> 2

```

atgtctccat ccccgaccgc cctcttctgt cttgggctgt gtctggggcg tgtgccagcg      60
cagagtggac cgctcccaa gccctccctc caggetctgc ccagctcct ggtgccctg      120
gagaagccag tgaccctcg gtgccagga cctccggcg tggacctgta ccgctggag      180
aagctgagtt ccagcaggta ccaggatcag gcagtcctct tcatcccggc catgaagaga      240
agtctggctg gacgctaccg ctgctcctac cagaacggaa gcctctggtc cctgcccagc      300
gaccagctgg agctcgttgc cacgggagtt tttgcaaac cctcgtctc agcccagccc      360
ggcccggcgg tgctcgcagg aggggacgta accctacagt gtcagactcg gtatggcttt      420
gaccaatttg ctctgtacaa ggaaggggac cctgcgcctt acaagaatcc cgagagatgg      480
taccgggcta gtttcccat catcacggtg accgcccgc acagcggaac ctaccgatgc      540
tacagcttct ccagcaggga cccatacctg tggtcggccc ccagcgaccc cctggagctt      600
gtggtcacag gaacctctgt gacccccagc cggttaccaa cagaaccacc ttctcggta      660
gcagaattct cagaagccac cgctgaactg accgtctcat tcacaacaa agtcttcaca      720
actgagactt ctaggagtat caccaccagt ccaaaggagt cagactctcc agctggtcct      780
gcccgccagt actacaccaa gggcaacggc ggccgcgagt ccaaattctg tgacaaaact      840
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttctcttc      900

```

[0005]

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtgggtg 960  
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1020  
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1080  
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1140  
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1200  
 cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1260  
 agcctgacct gcctggtaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1320  
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1380  
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1440  
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1500  
 tctccgggta aatga 1515

<210> 3  
 <211> 490  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<400> 3

Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly  
 1 5 10 15

Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala  
 20 25 30

Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys  
 35 40 45

Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser  
 50 55 60

Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg  
 65 70 75 80

[0006]

Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp  
 85 90 95

Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala  
 100 105 110

Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly  
 115 120 125

Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala  
 130 135 140

Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp  
 145 150 155 160

Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly  
 165 170 175

Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser  
 180 185 190

Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr  
 195 200 205

Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser  
 210 215 220

Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr  
 225 230 235 240

Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser  
 245 250 255

Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Gly Gly Arg  
 260 265 270

[0007]

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 275 280 285

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 290 295 300

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 305 310 315 320

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 325 330 335

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 340 345 350

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 355 360 365

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 370 375 380

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 385 390 395 400

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 405 410 415

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 420 425 430

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 435 440 445

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 450 455 460

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0008]

465	470	475	480
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	485	490	
<210> 4			
<211> 37			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> PCR 引物			
<400> 4			
cgcggggcgg ccgcgagtcc aaatcttgtg acaaaac			37
<210> 5			
<211> 33			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> PCR 引物			
<400> 5			
gcgggaagct ttcatttacc cggagacagg gag			33
<210> 6			
<211> 36			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> PCR 引物			
<400> 6			
gcggggagat ctaccacat gtctccatcc cggacc			36
<210> 7			
<211> 34			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			

[0009]

---

<223> PCR 引物	
<400> 7	
cgcggggcgg ccgccgttgc ccttggtgta gtac	34
<210> 8	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 8	
cgcggggcgg ccgcccagca cctgaactcc tg	32
<210> 9	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 9	
cgcggggata tctcatttac ccggagacag ggag	34

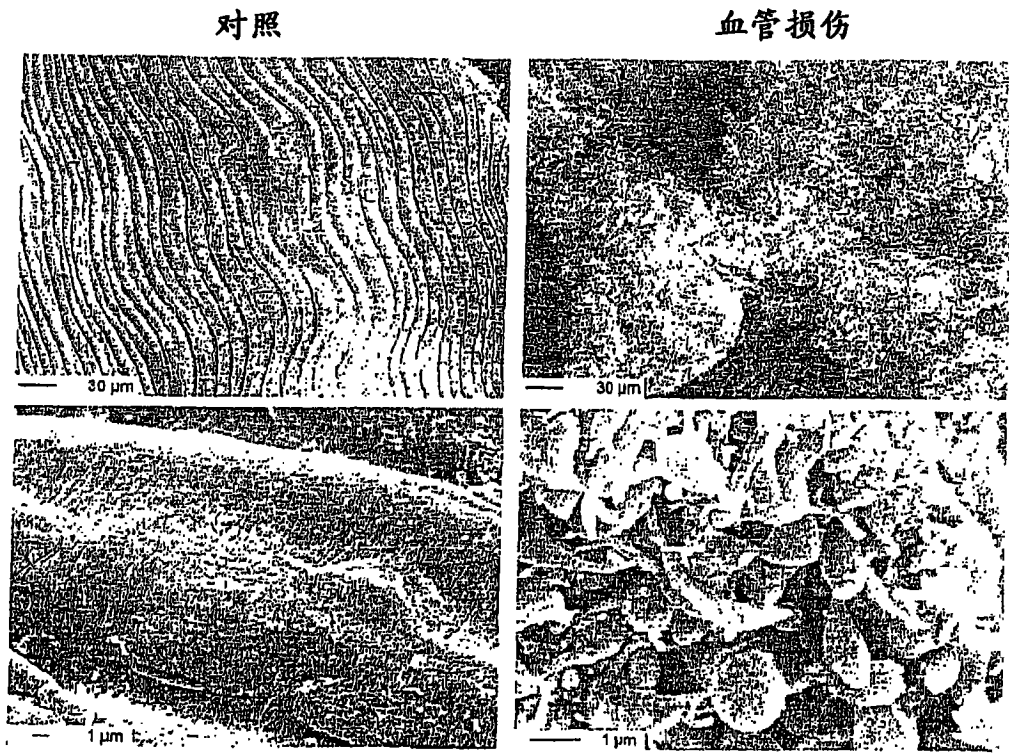


图 1a

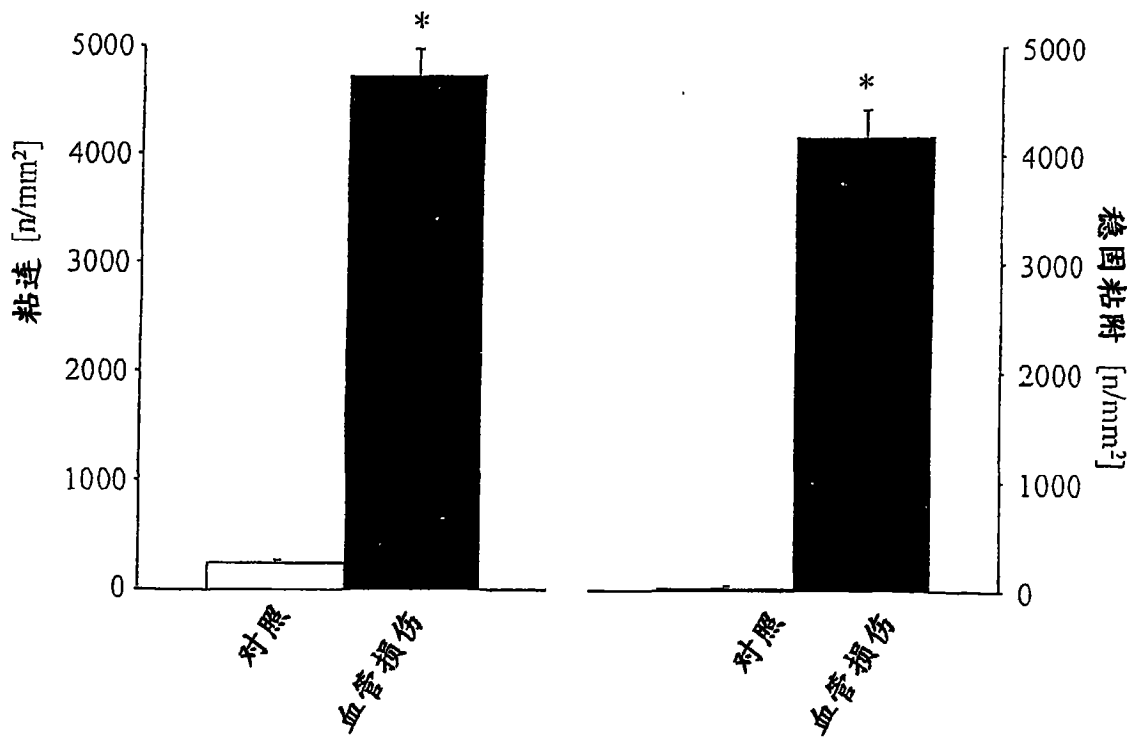


图 1b

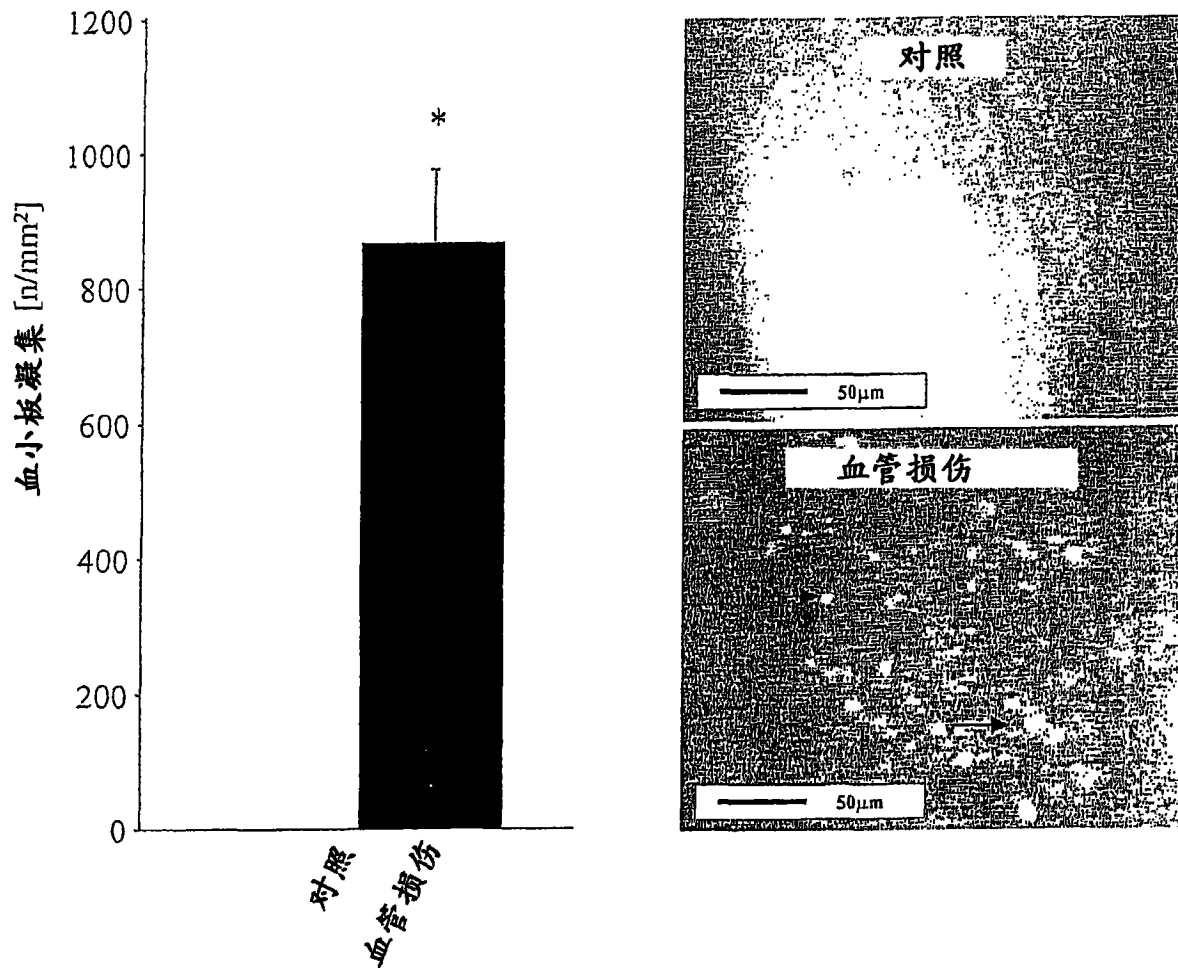


图 1c

图 2a

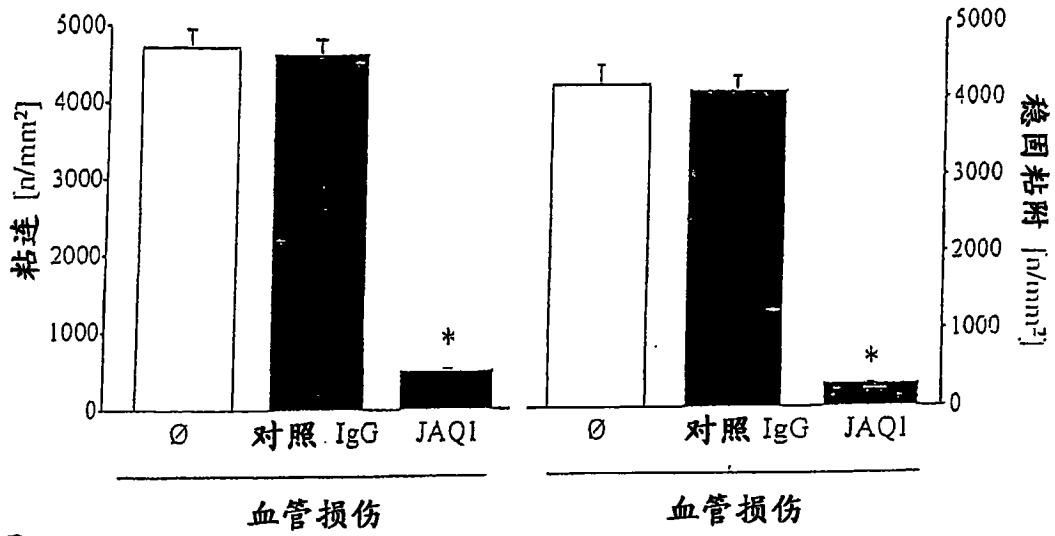


图 2b

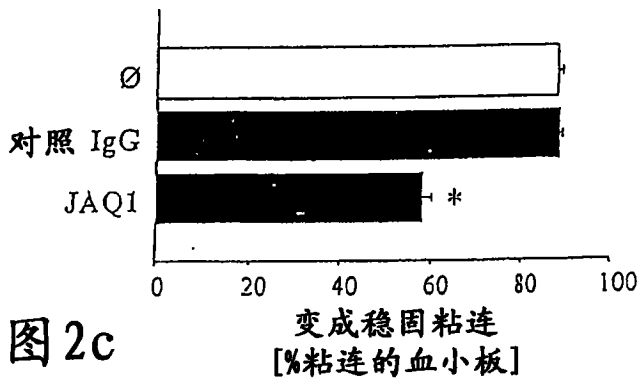


图 2c

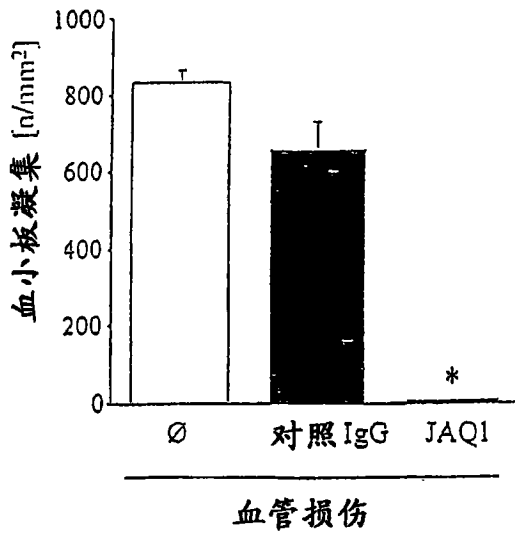
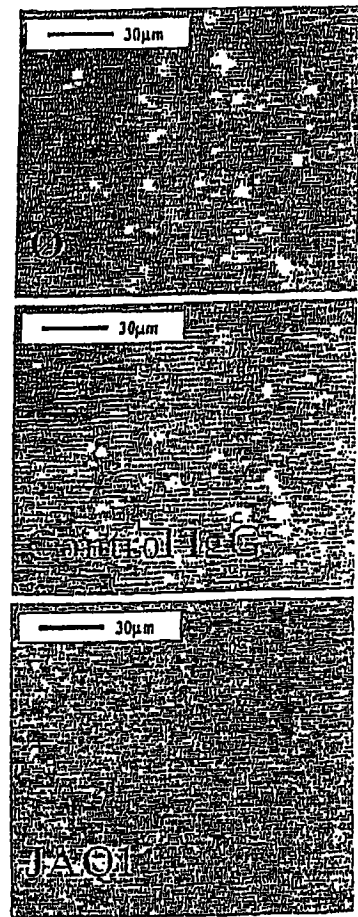


图 2d



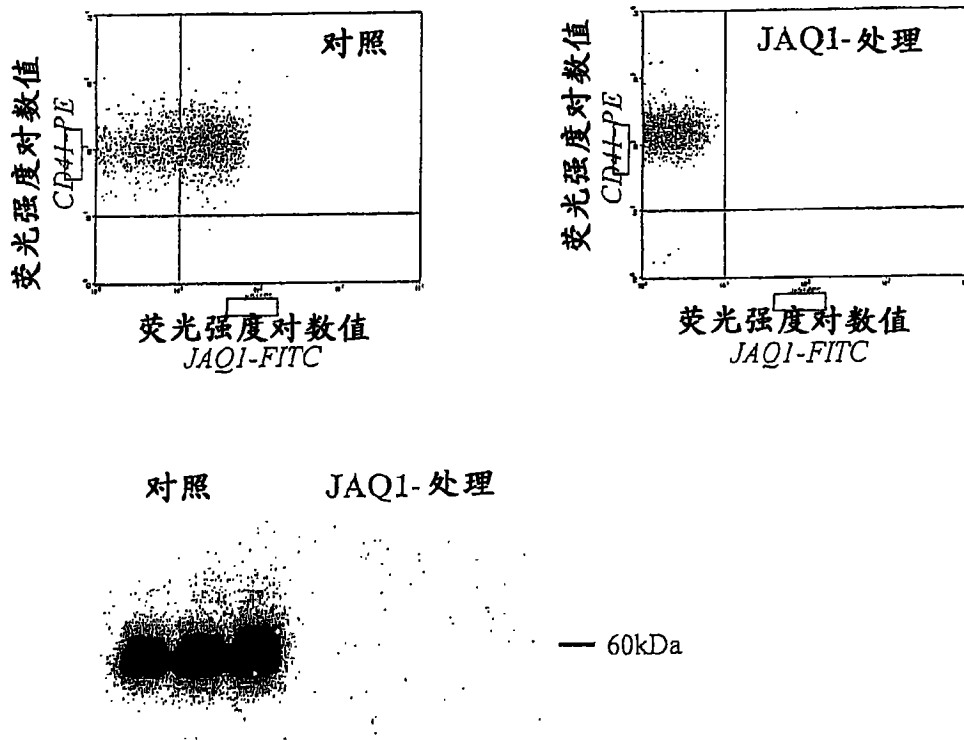


图 3a

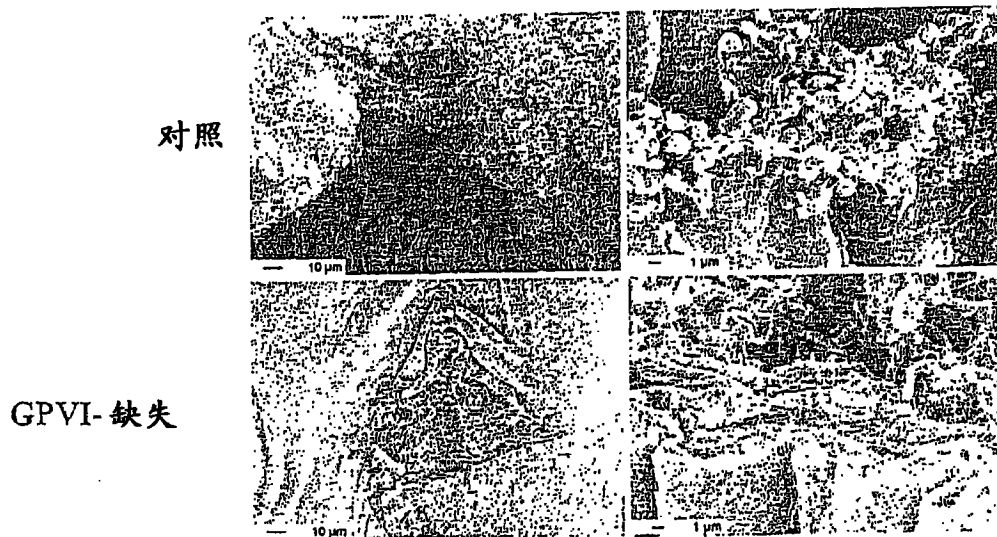


图 3b

图 3c

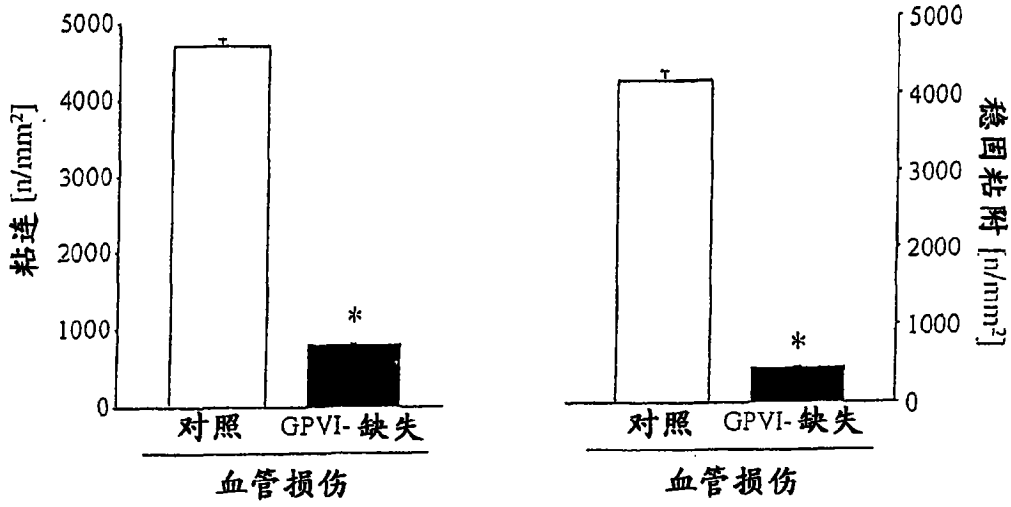


图 3d

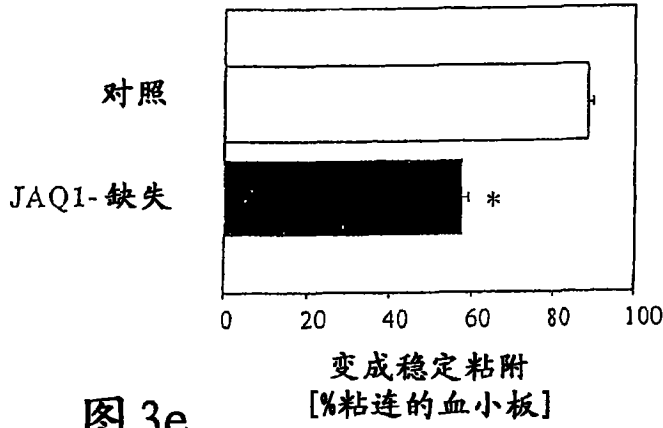
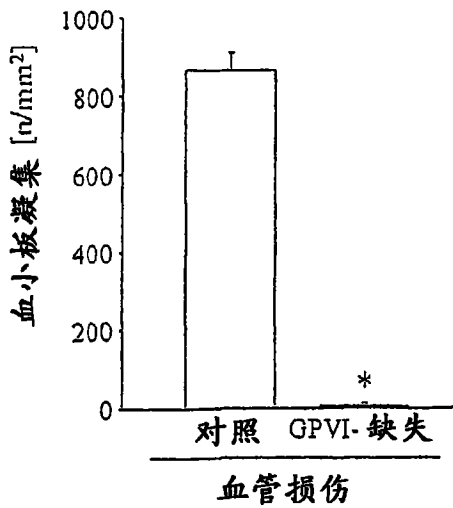


图 3e



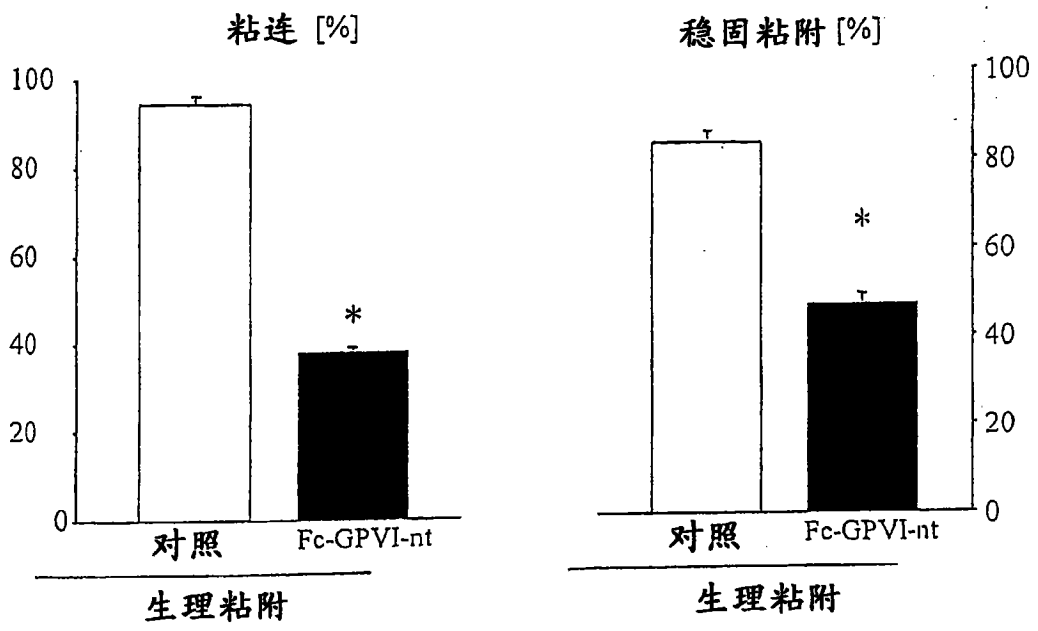


图 4

Fc-GPVI-n1 与牛I型胶原蛋白结合

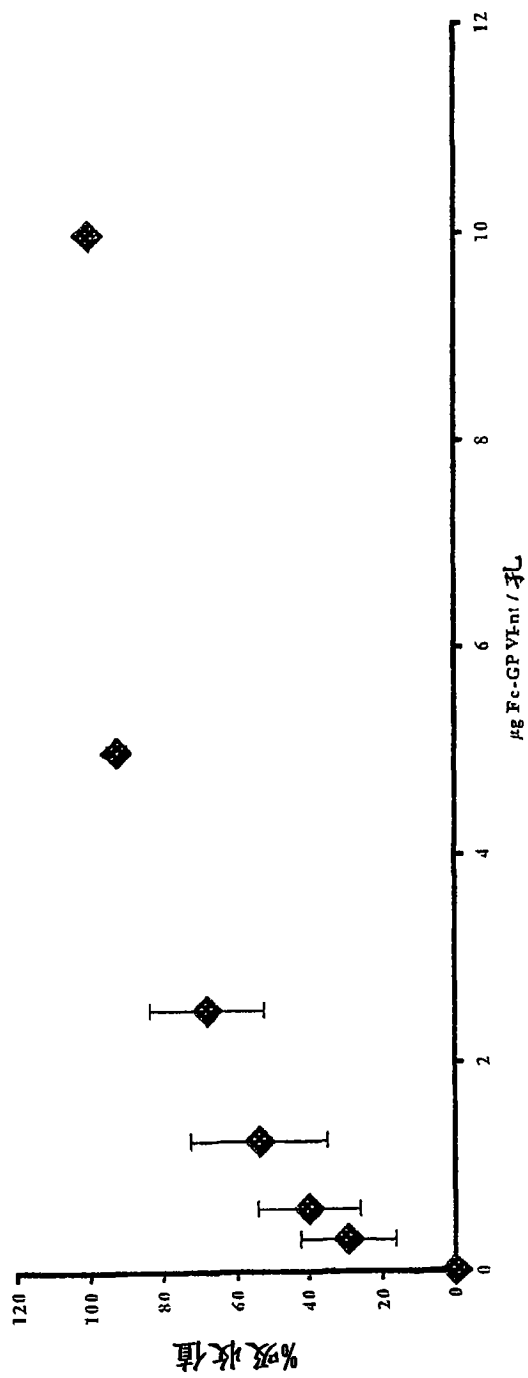


图5

对照

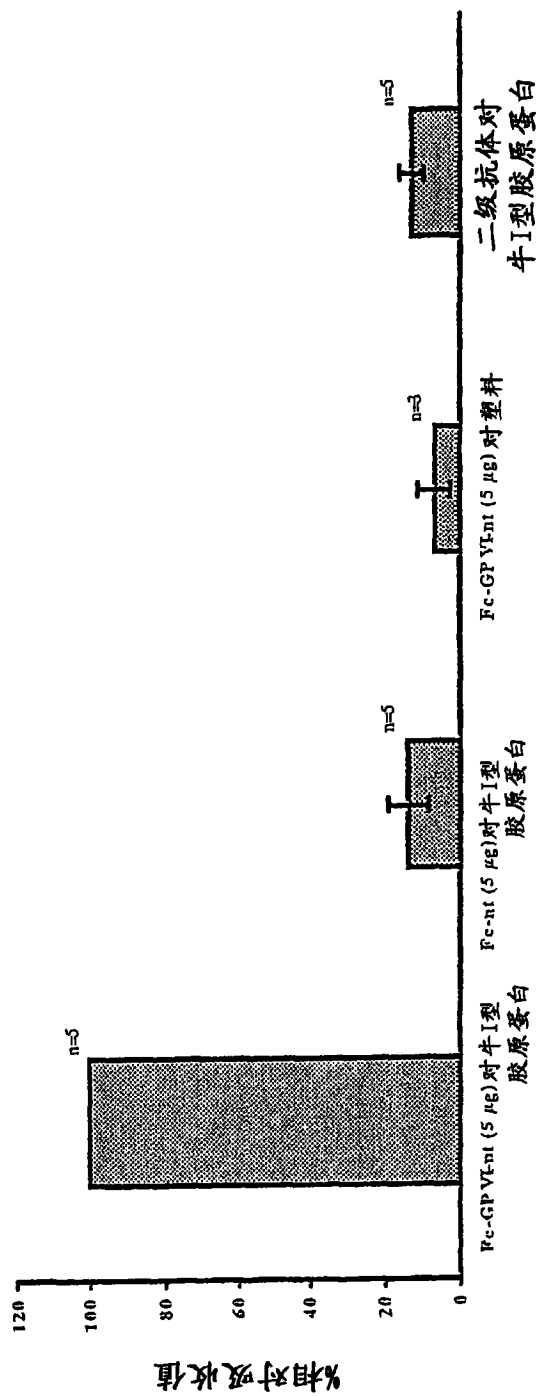


图6

1 MSPSP TALFC LGLCLGRVPA QSGPLPKPSL QALPSSLVPL EKPVTLRCQG  
51 PPGVDLYRLE KLSSSRYQDQ AVLFIPAMKR SLAGRYRCSY QNGSLWSLPS  
101 DQLELVATGV FAKPSLSAQF GPAVSSGGDV TLQCQTRYGF DQFALYKEGD  
151 PAPYKNPERW YRASFPITV TAAHSGTYRC YSFSSRDPYL WSAPSDPLEL  
201 VVTGTSVTPS RLPTEPPSSV AEFSEATAEL TVSFTNKVFT TETSR SITTS  
251 PKESDSPAGP ARQYYTKGNG GRESKSCDKT HTCPCPAPPE LLGGPSVFLF  
301 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE  
351 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
401 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
451 TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL  
501 SPGK\*

图 7

1 ATGTCTCCAT CCCCACC GC CCTCTTCTGT CTTGGGCTGT GTCTGGGGCG  
51 TGTGCCAGCG CAGAGTGGAC CGCTCCCCAA GCCCTCCCTC CAGGCTCTGC  
101 CCAGCTCCCT GGTGCCCTG GAGAAGCCAG TGACCCCTCCG GTGCCAGGGA  
151 CCTCCGGGCG TGGACCTGTA CCGCCTGGAG AAGCTGAGTT CCAGCAGGTA  
201 CCAGGATCAG GCAGTCCTCT TCATCCCGGC CATGAAGAGA AGTCTGGCTG  
251 GACGCTACCG CTGCTCCTAC CAGAACGGAA GCCTCTGGTC CCTGCCCAGC  
301 GACCAGCTGG AGCTCGTTGC CACGGGAGTT TTTGCCAAAC CCTCGCTCTC  
351 AGCCAGCCC GGCCCGGCGG TGTCGTCAGG AGGGGACGTA ACCCTACAGT  
401 GTCAGACTCG GTATGGCTTT GACCAATTTG CTCTGTACAA GGAAGGGGAC  
451 CCTGCGCCCT ACAAGAATCC CGAGAGATGG TACCGGGCTA GTTTCCCCAT  
501 CATCACGGTG ACCGCCGCC ACAGCGGAAC CTACCGATGC TACAGCTTCT  
551 CCAGCAGGGA CCCATACCTG TGGTCGGCCC CCAGCGACCC CCTGGAGCTT  
601 GTGGTCACAG GAACCTCTGT GACCCCCAGC CGGTTACCAA CAGAACCACC  
651 TTCTCGGTA GCAGAATTCT CAGAAGCCAC CGCTGAACTG ACCGTCTCAT  
701 TCACAAACAA AGTCTTCACA ACTGAGACTT CTAGGAGTAT CACCACCAGT  
751 CCAAAGGAGT CAGACTCTCC AGCTGGTCCT GCCCGCCAGT ACTACACCAA  
801 GGGCAACGGC GGCCCGGAGT CCAAATCTTG TGACAAACT CACACATGCC  
851 CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC  
901 CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC  
951 ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT  
1001 GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG  
1051 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA  
1101 CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG  
1151 CCCTCCAGC CCCATCGAG AABACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC  
1201 CGAGAGCCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA  
1251 GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA  
1301 TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACPA CTACAAGACC  
1351 ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT  
1401 CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG  
1451 TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAGAG CCTCTCCCTG  
1501 TCTCCGGGTA AATGA

图 8

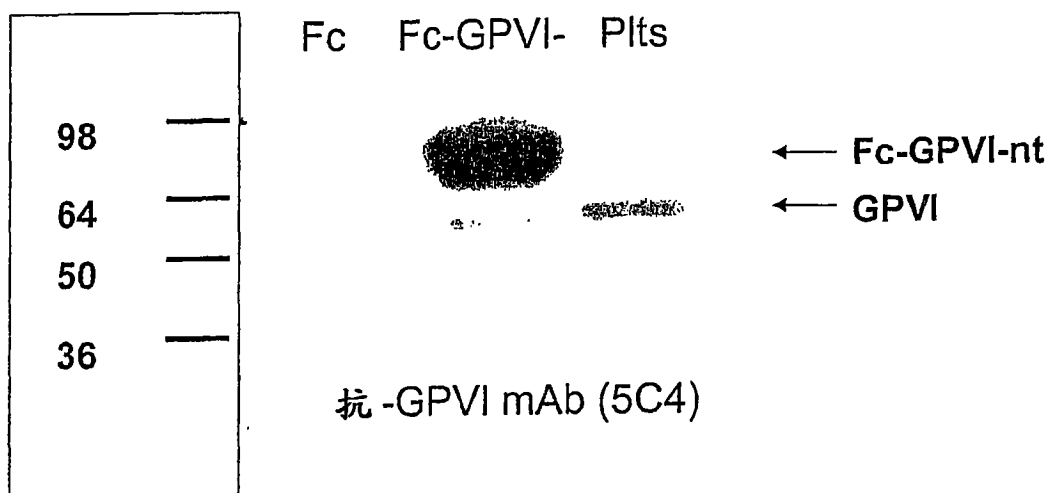
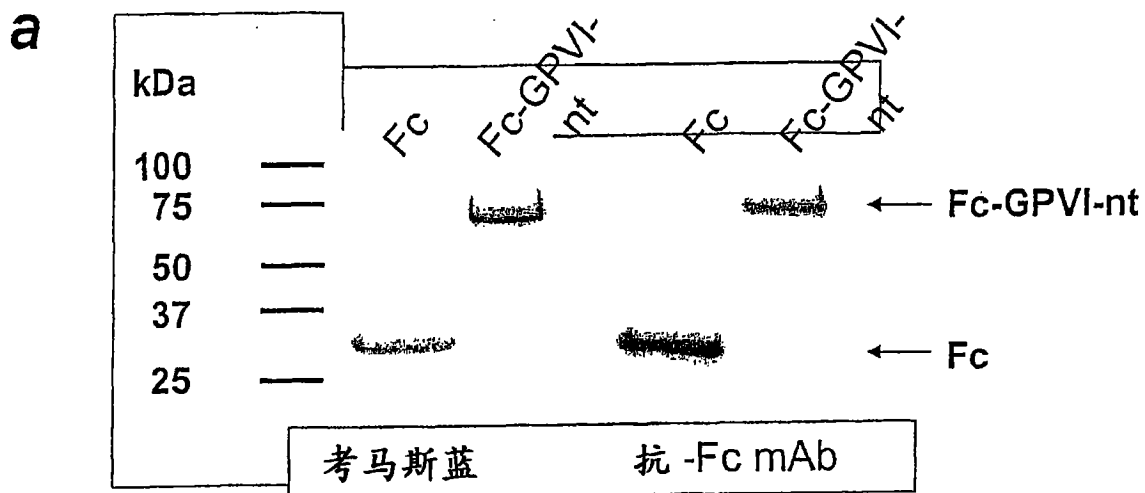
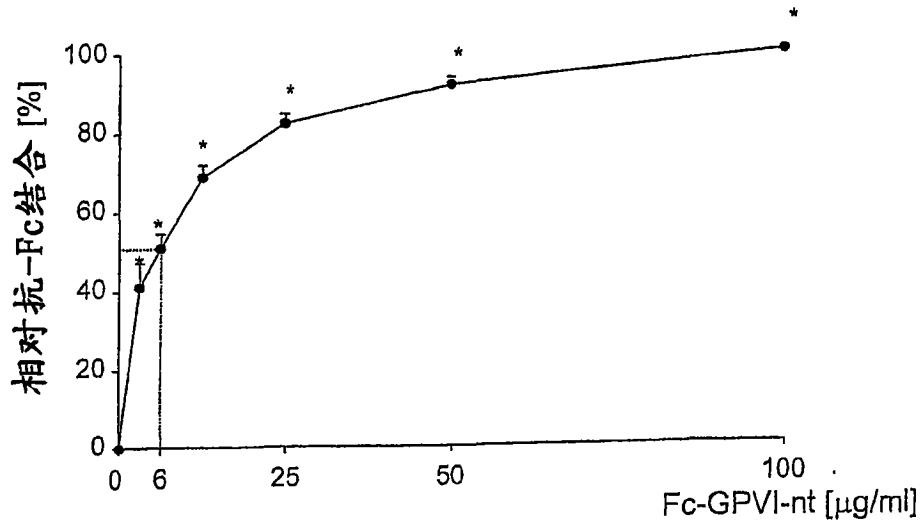
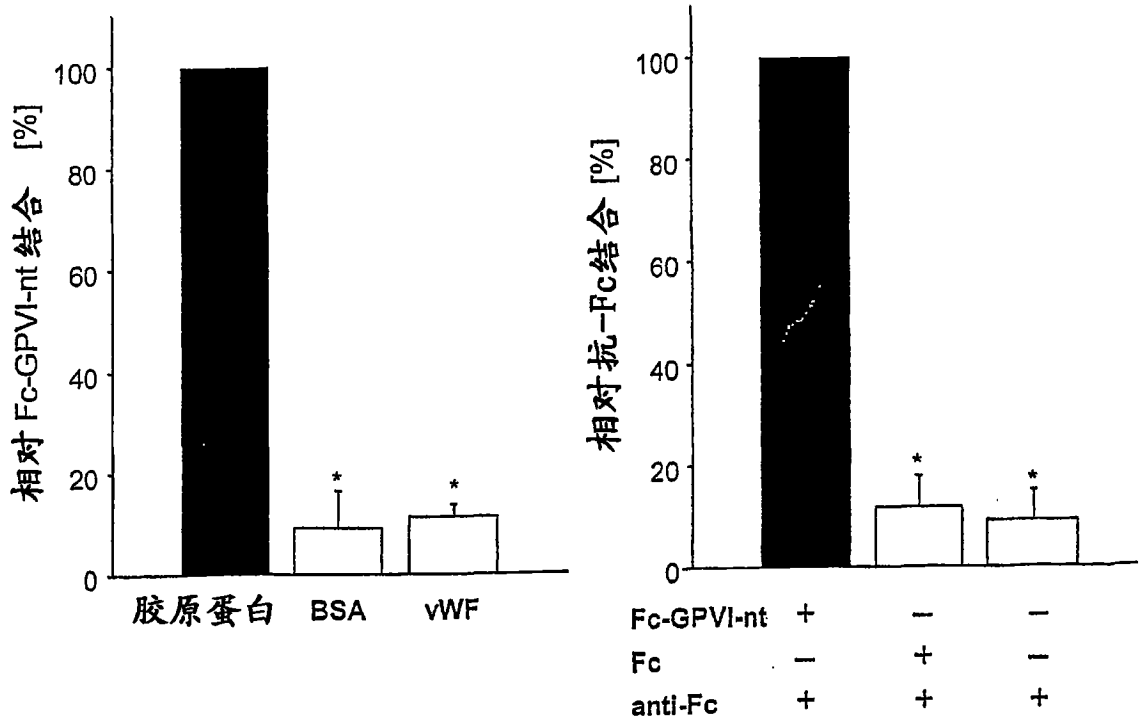


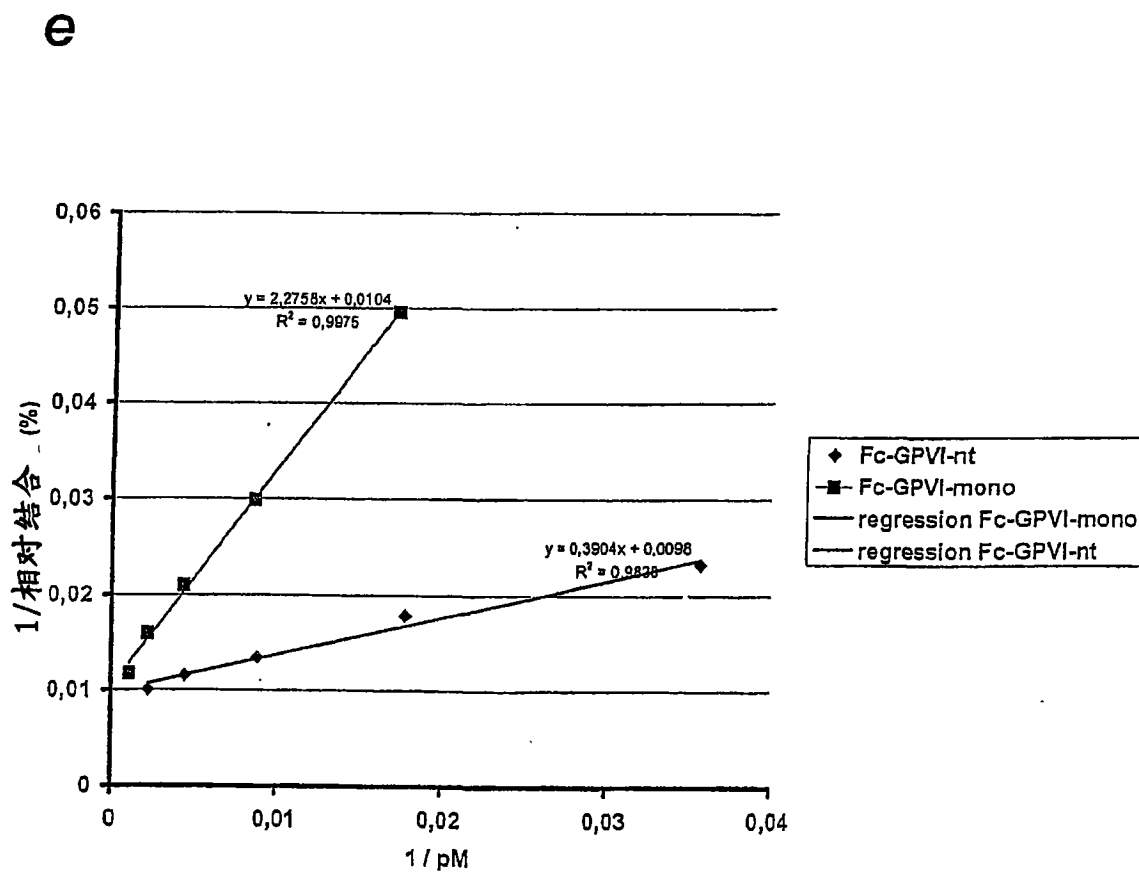
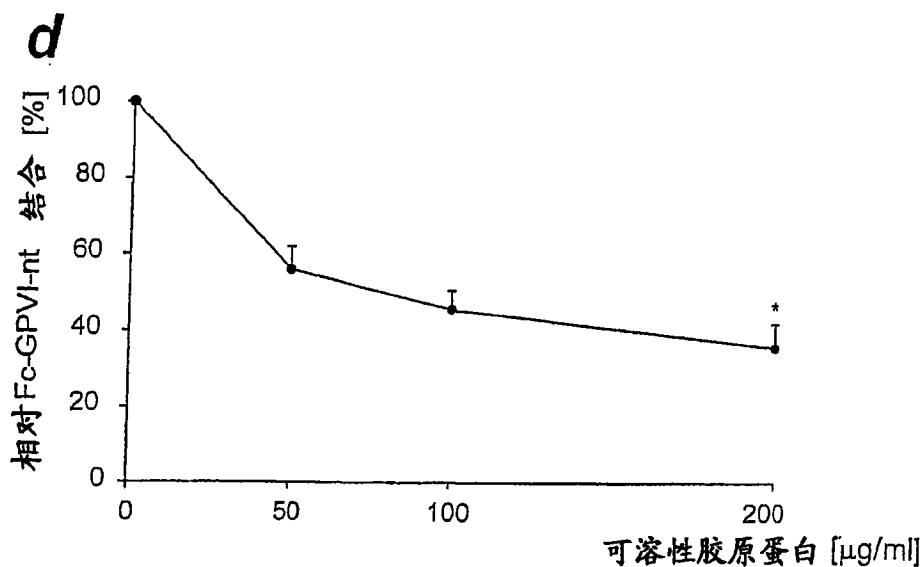
图 9

**b**



**c**





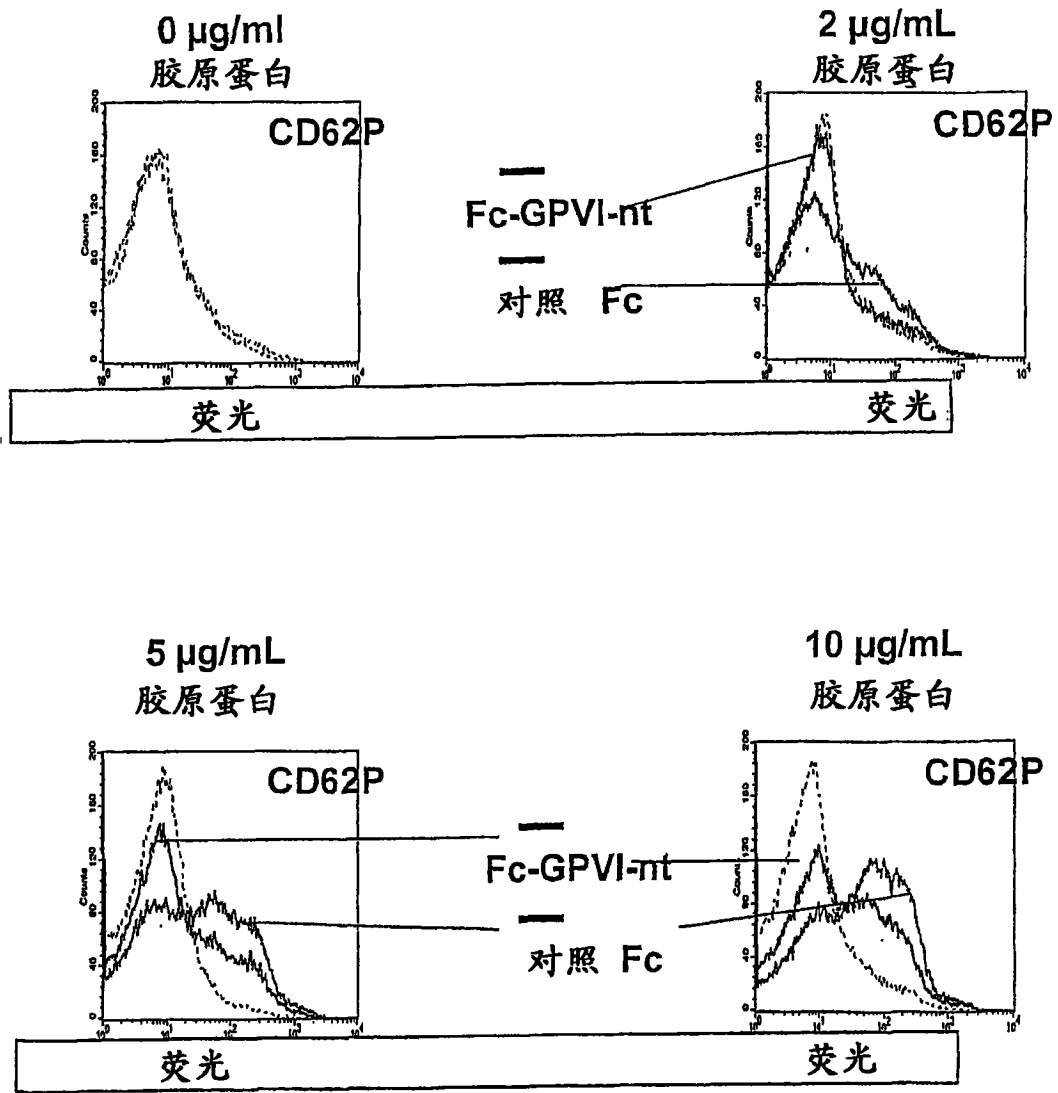


图 10

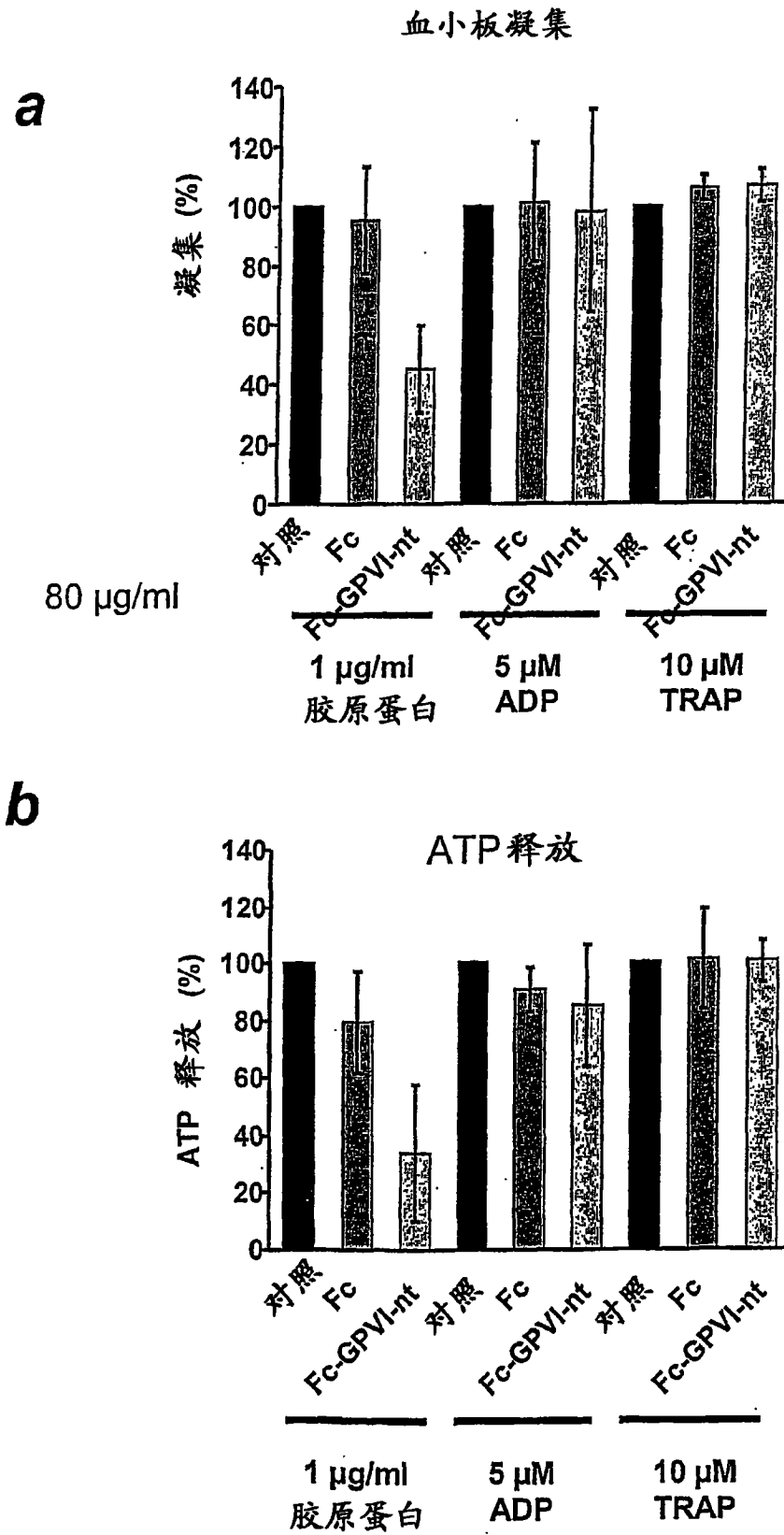
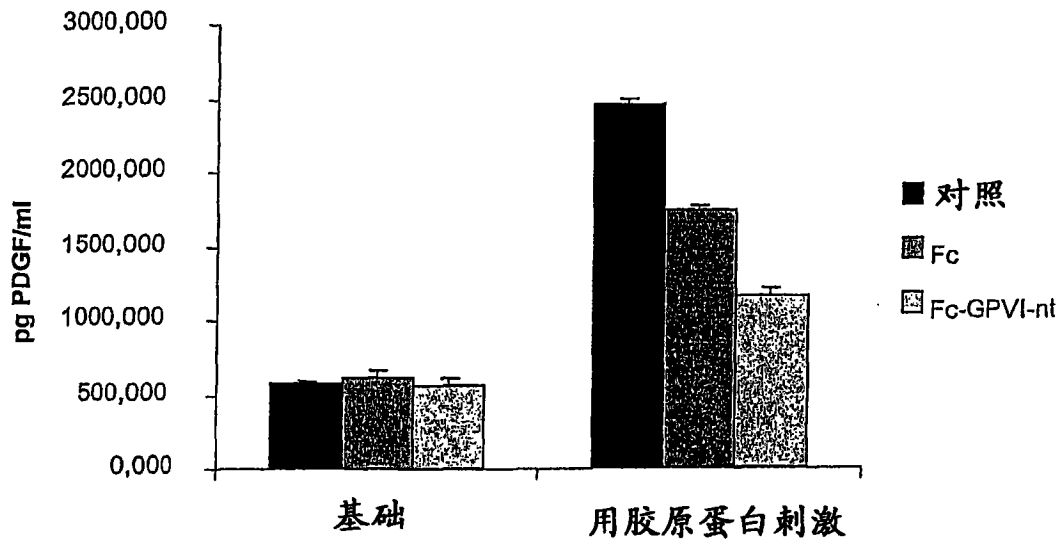


图 11

C

PDGF从人类血小板释放



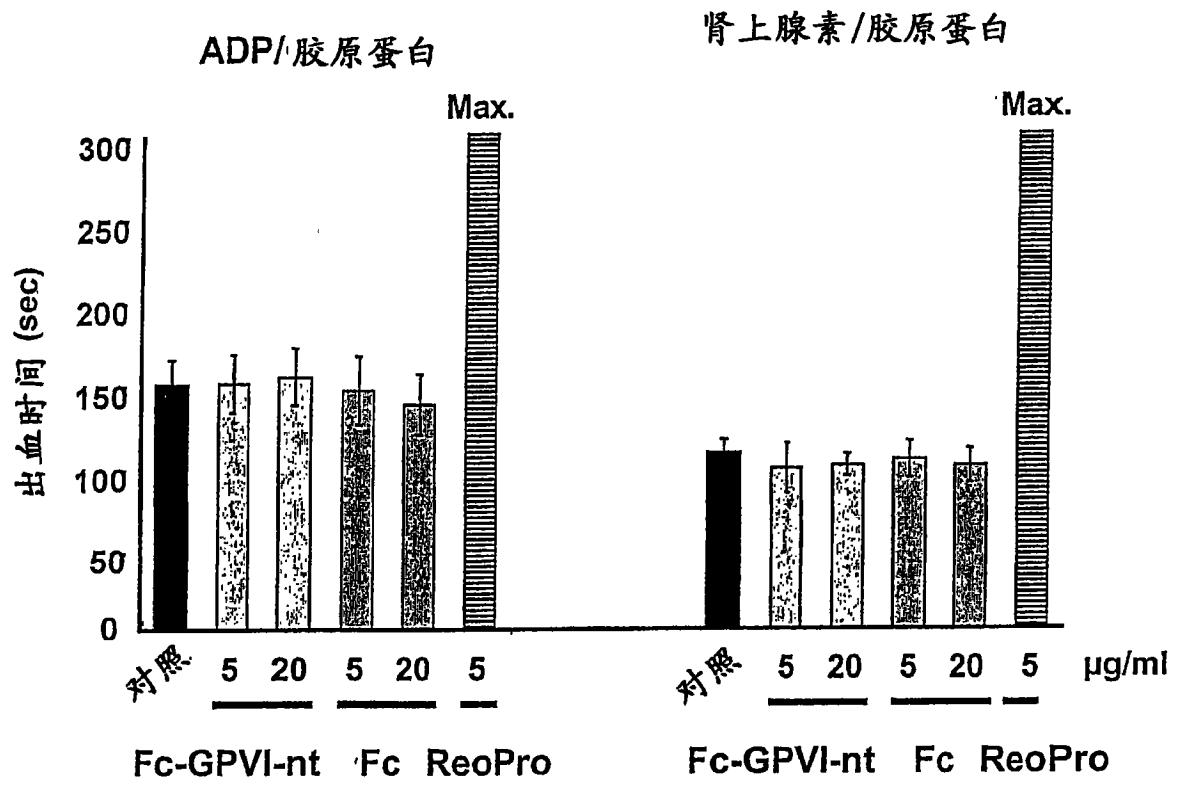


图 12

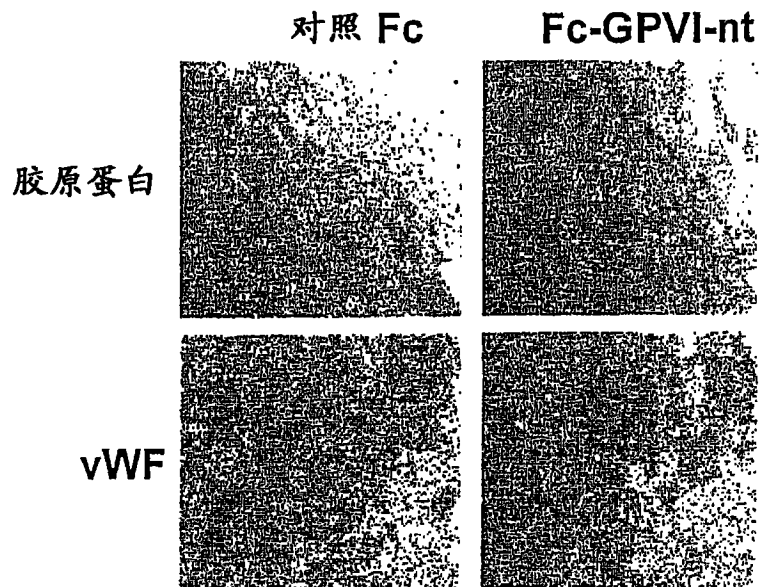
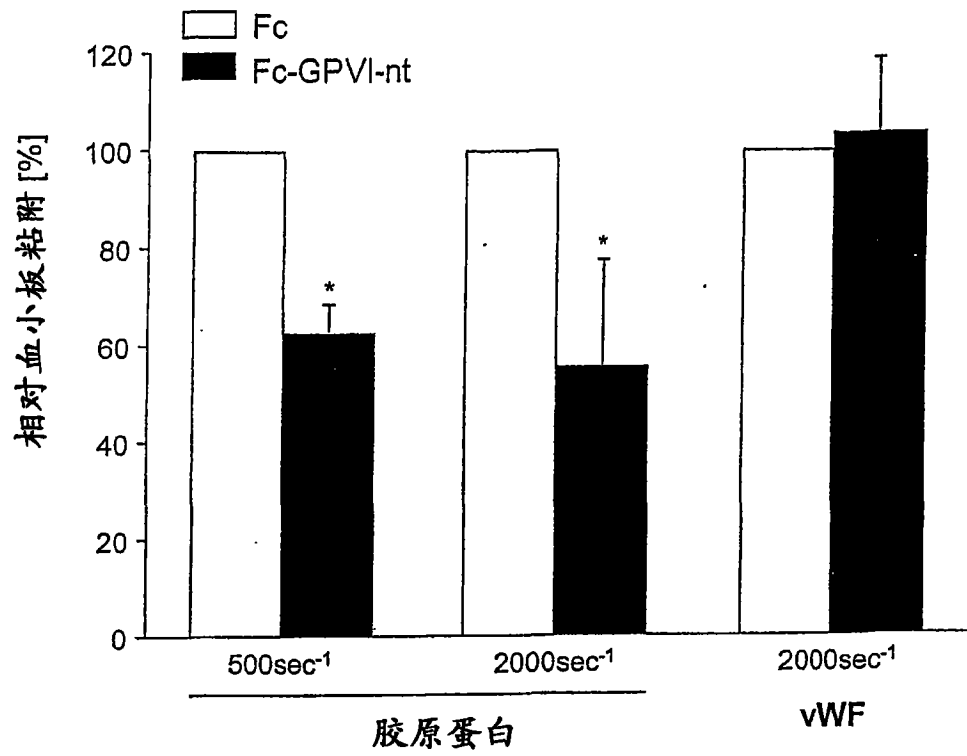
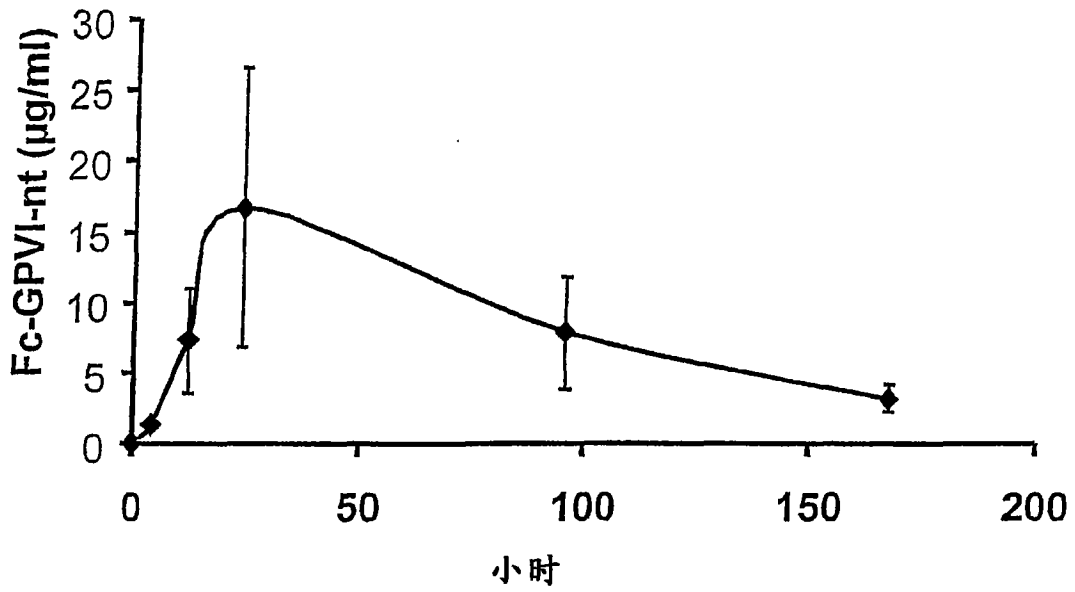


图 13

**a**

**Fc-GPVI-nt单剂量药代动力学**



**b**

**Fc-GPVI-nt 重复剂量药代动力学**

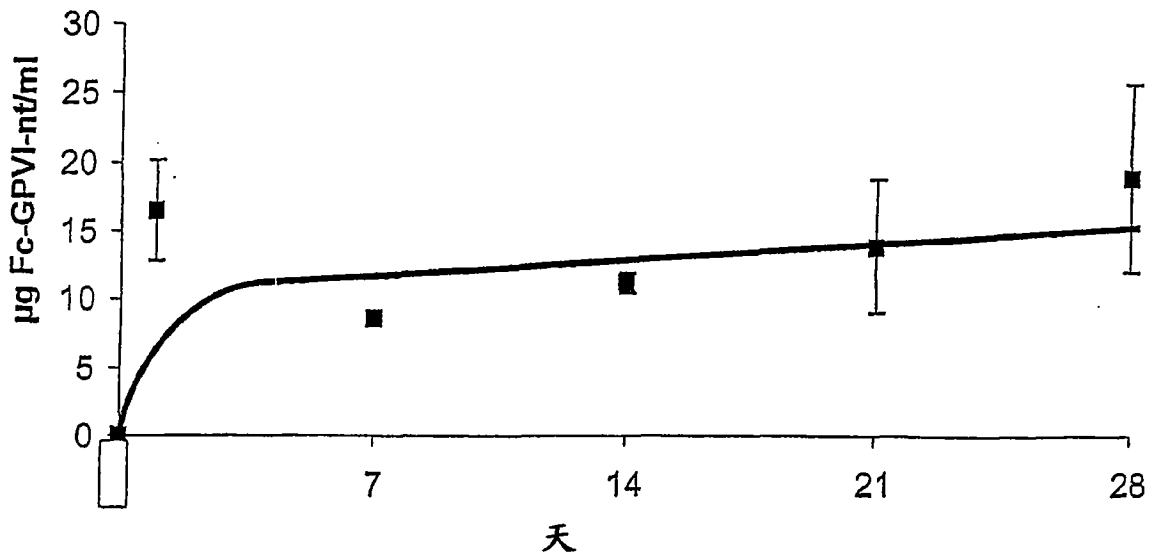
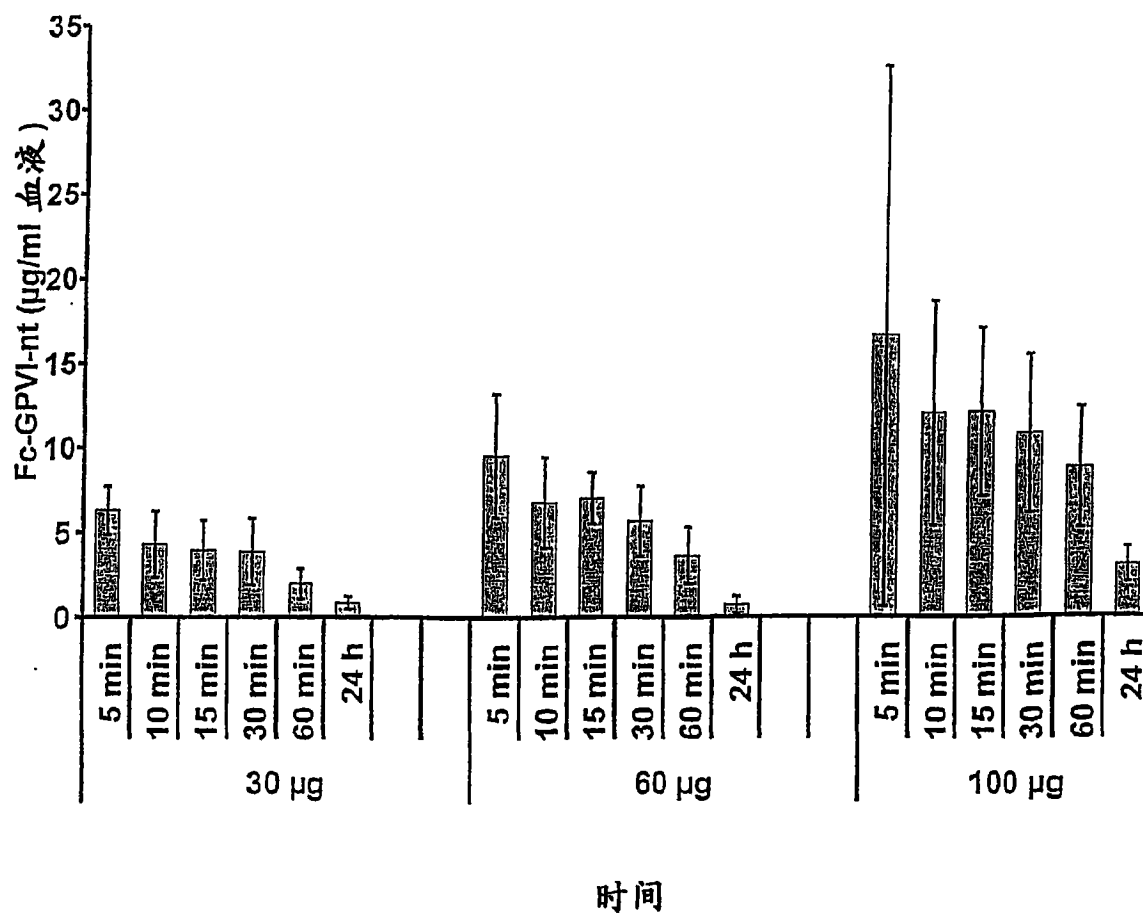


图 14

C

小鼠中IV药代动力学



**a**

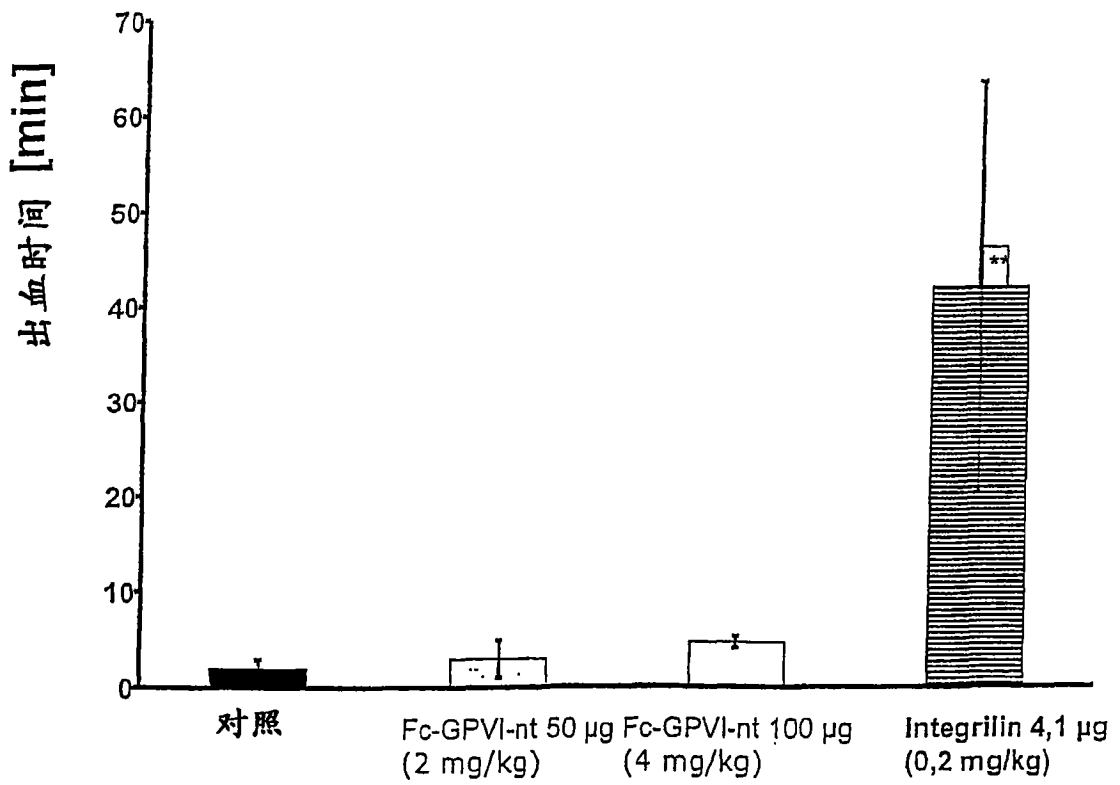
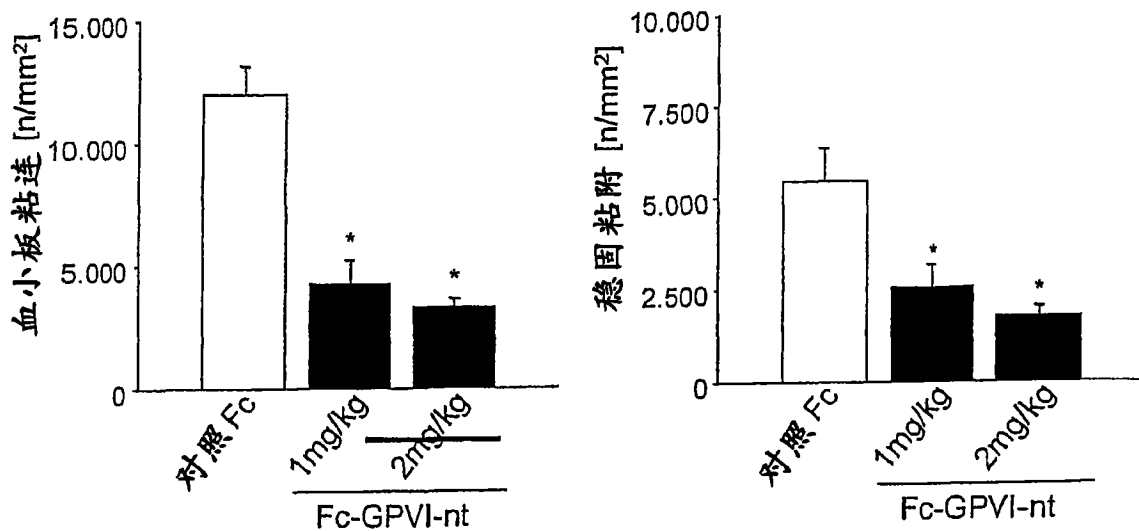
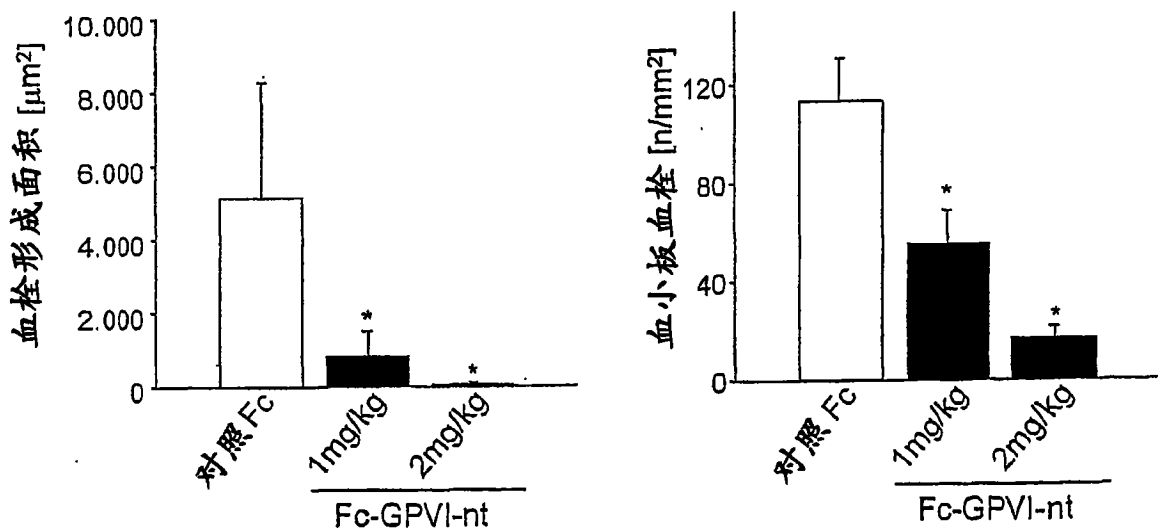


图 15

**b**



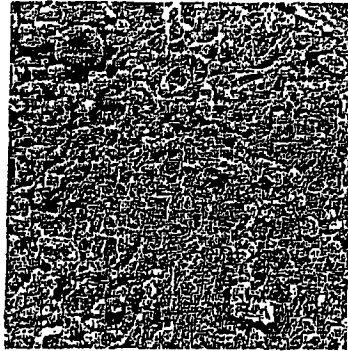
**c**



**d**



**e**



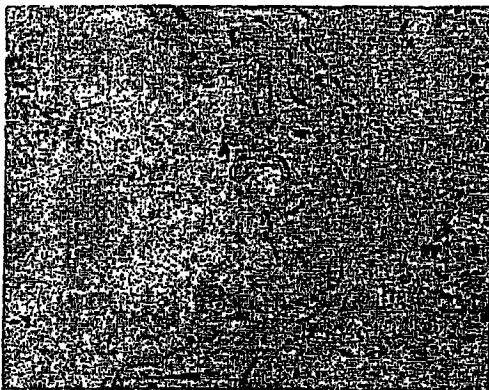
Fc



Fc-GPVI-nt

**f**

Fc



Fc-GPVI-nt



**Fc-GPVI-nt**



**Fc**

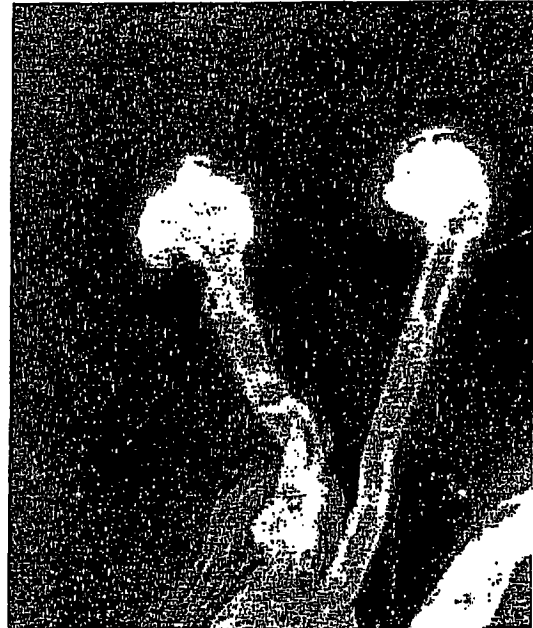
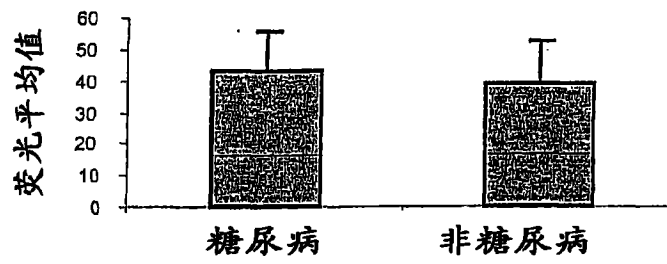
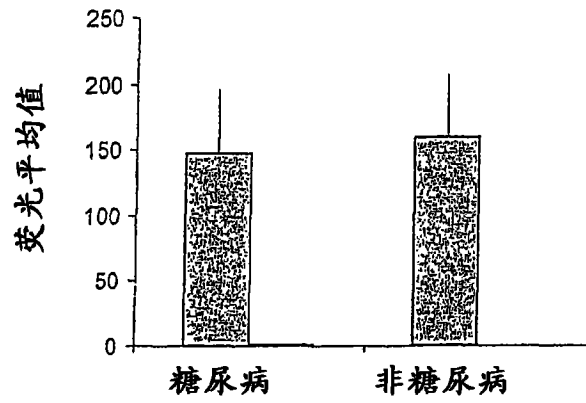
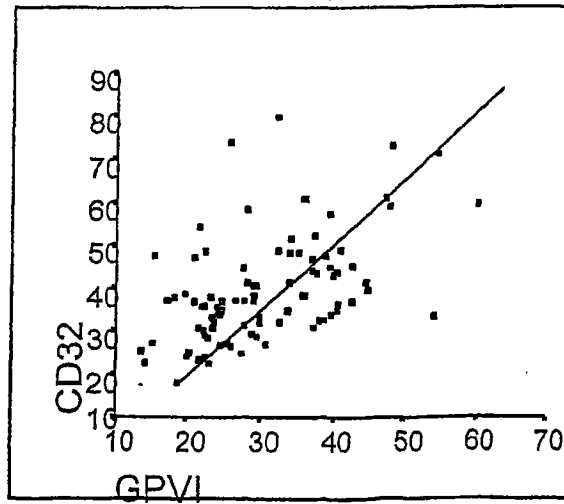


图 16

CD61在人类血小板上的表达



CD32-GPVI 相关性



$p < 0,0001$

$r = 0,516$

图 17

MSPSPTALFCLGLCLGRVPAQSGPLPKPSLQALPSSLVPLEKPVTLRCQGPPGVDLYRLEKLSSSRYQDQ  
AVLFIPAMKRSLAGRYRCSYQNGSLWLSLPSDQLELVATGVFAKPSLSAQPGPAVSSGGDVTLCQTRYG  
FDQFALYKEGDPAPYKNPERWYRASFPITVTAHSGTYRCYSFSSRDPYLWSAPSDPLELVVTGTSVTP  
SRLPTEPPSSVAEFSEATAELTVSFTNKVFTTETSRSTITTSPKESDSPAGPARQYYTKGN~~GG~~PAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT  
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

图 18

专利名称(译)	含有糖蛋白VI结构域的免疫粘附素		
公开(公告)号	<a href="#">CN1668721B</a>	公开(公告)日	2012-11-14
申请号	CN03817279.8	申请日	2003-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	普罗克得有限公司		
申请(专利权)人(译)	普罗克得有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	克利姆恩有限公司		
[标]发明人	S玛斯彼尔格 M伽瓦兹 A布尔特曼 G曼驰 M安格尔 M佩鲁索		
发明人	S·玛斯彼尔格 M·伽瓦兹 A·布尔特曼 G·曼驰 M·安格尔 M·佩鲁索		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 G01N33/53 A61P7/02 A61K31/4035 A61K31/4704 A61K31/55 A61K38/00 A61K47/48 A61P25/36 C07D209/44 C07D217/02 C07D223/16 C07K14/705 C07K14/745 C07K16/28 G01N33/50 G01N33/86		
CPC分类号	C07K14/70503 C07K16/2803 A61K47/48415 C07K2319/00 G01N33/5088 C07K14/745 C07K19/00 A61K38/00 A61K2039/505 G01N33/86 C07K2319/30 C12N2799/021 A61K47/6811 A61P25/36 Y02A50 /407		
代理人(译)	程泳		
审查员(译)	贾涛		
优先权	2002012742 2002-06-07 EP		
其他公开文献	CN1668721A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种融合蛋白，它包括：(a)糖蛋白VI细胞外结构域或其具有胶原蛋白结合功能的变体，和(b)免疫球蛋白的Fc结构域或其功能保守性部分。该融合蛋白的特征在于附图7所示的氨基酸序列，而且该融合蛋白可获自一种以特异二聚体形式提供该融合蛋白的方法。

对照

血管损伤

