



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-1981

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO POLIPÉPTIDOS DE FUSION VARIANTE ALFA 1B DE
GLICOPROTEINA DE PLAQUETA Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K14/755, A61K38/16, A61P7/02, A61K38/17

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ DIAZMAN

22. BOGOTÁ, D. C., ENERO 33/06

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL: 2006-01-11

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ ~~Patente de invención~~	
☒ Capítulo I.		☐ ~~Capítulo I.~~	
2) SOLICITANTE (71)		Nombre: WYETH Dirección: A corporation of the State of Delaware, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940. Estados Unidos de America Nacionalidad o domicilio: Estados Unidos de America Lugar de constitución: Estados Unidos de America Teléfono: Fax: E. Mail:	
3) REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	
4) INVENTOR (ES) (72)		Nombre: 1. SHAW, Gray 2. SAKO, Dianne, 3. KUMAR, Ravindra 4. XU, Jin Dirección : 1. 8 Lancaster Lane, Milton, MA 01286. 2. 14 Mystic Street, Medford, MA 02155. 3. 421 Arlington Street, Acton, MA 01720. 4. 47 Kelly Road, Dracut, MA 01826. Nacionalidad o Domicilio: 1.Estados Unidos. 2.Estados Unidos. 3.Estados Unidos. 4.China-Estados Unidos.	
5) PCT (88) Solicitud Internacional No. PCT/US 2004/019057 Fecha: Junio 14, 2004 Publicación Internacional No. WO 2004/111089 A2 Fecha: Diciembre 23, 2004			
6) Título (54) POLIPEPTIDOS DE FUSION VARIANTE ALFA IB DE GLICOPROTEINA DE PLAQUETA Y METODOS DE USO DE ESTOS			
7) Clasificación Internacional: C07K 14/785, A61K 38/16, A61P 7/02, A61K 38/17			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ N ☐		Estados Unidos	Jun 11, 2003
		(31) Número de Solicitud	60/477.625
9) Comprobante de pago N°. 05- 96.752 Fecha: Diciembre 21 de 2005 N°. 06- 571 Fecha: Enero 4, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página			

7-7251

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacon : 06001981 00000000 Folios: 144
Fecha (AMD): 2006-01-11 16:52:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 PAGE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 06001981 00000000 Folios: 144
Fecha (AMD): 2006-01-11 16:52:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 PAGE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 96,752
FECHA : DICIEMBRE 21 DE 2005

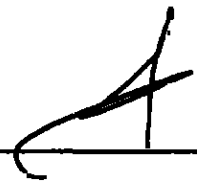
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	42212707	20/12/2005	2,533,960.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicacion : 06001981 000000000 Folios: 144
Fecha (AMD): 2006-01-11 16:52:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 06 - 571
FECHA : ENERO 4 DE 2006

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 06001981 000000000 Folios: 144
Fecha (AMD): 2006-01-11 16:52:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CO. COLON	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50530984	03/01/2006	7,554,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

MON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : 
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

4

10)

ANEXOS

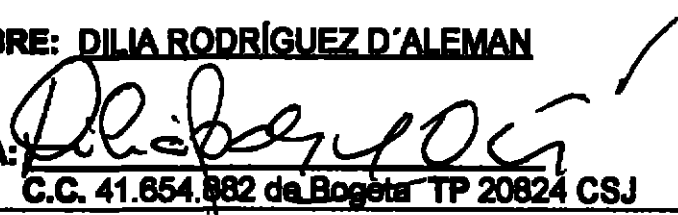
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☒ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros:
 1. Reporte de búsqueda Internacional
 2. Opinión escrita
 3. Notificación de cambio de dirección.

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:



C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 05/214 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido por el Ministerio del Interior y de Justicia, por resolución número 718 de 2003 y autorizado por el Ministerio de relaciones Exteriores de Colombia.

(Se traduce Certificado Notarial y Apostilla No. 1063285, escritos en inglés, adjuntos a un poder otorgado por la compañía WYETH, firmado por M. Andrea Ryan, Secretaria Asistente, con fecha Marzo 21, 2005 escrito en español e inglés.)

(En español e inglés, poder otorgado por la compañía WYETH, firmado por M. Andrea Ryan, , con fecha Marzo 21, 2005, una (1) hoja).

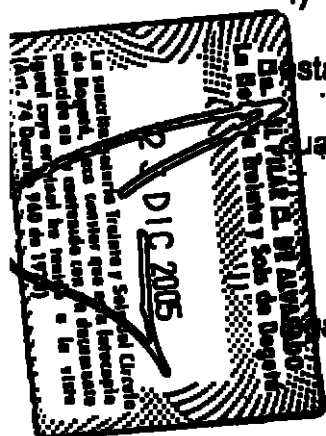
CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es una SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en El Salvador, México, Estados Unidos de América y Venezuela)

Expedido hoy día Marzo 21, 2005, el suscrito Notario CERTIFICA que:

- 1) M. Andrea Ryan, (nombre de quien firma el poder), mayor de edad y domiciliado en Massachusetts, suscribió el anterior documento.
- 2) El otorgante le es conocido personalmente y tiene capacidad para firmar el documento.
- 3) El otorgante ha suscrito el anterior documento en su calidad de Secretaria Asistente de la persona jurídica WYETH.
- 4) La mencionada persona jurídica con domicilio comercial en Cambridge, MA, está debidamente constituida, tiene actualmente existencia legal y el fin para el cual se otorga este poder se encuentra dentro de su objeto social.

El otorgante tiene en efecto la capacidad referida y su representación es legal y está autorizado para otorgar este poder.



6) Fundamento las certificaciones 3), 4) y 5) en los documentos auténticos que para tal fin me fueron exhibidos.

(Firmado) JILL MARCOTTE

Notario Público

(Sello Notarial a Tinta: JILL MARCOTTE, Notario Público, Mancomunidad de Massachusetts, Mi Comisión vence Febrero 6, 2009)

Nota: El Consulado de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia de: 1) la existencia legal de la sociedad, 2) que cumple actualmente con su objeto social, y 3) que la persona o personas que otorgan este poder están facultadas para hacerlo. El Cónsul también certificará que los tuvo a la vista los documentos que prueban y acreditan tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CÓNsul DE COLOMBIA A O POR APOSTILLA

La Mancomunidad de Massachusetts

William Francis Galvin

Secretario de la Mancomunidad

APOSTILLA

(Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público...
2. Ha sido firmado por JILL MARCOTTE
Actuando en calidad de Notario Público
En el Estado de Massachusetts, cuya comisión expira el 6 de Febrero, 2009.

CERTIFICADA

En Boston Massachusetts

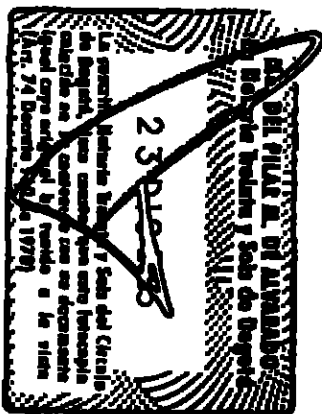
Hoy 22 de Abril, 2005

7. Por El Secretario de la Mancomunidad
8. 1063285
9. Firmado bajo el Gran Sello de la Mancomunidad (Sello de Oblea Dorada con Cinta Azul)
10. Firma (Firmado)
William Francis Galvin
Secretario de la Mancomunidad

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Mayo 3, 2006.

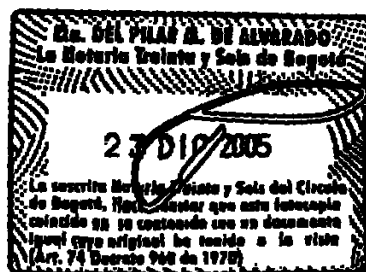
Juan Pablo Piedrahíta Aguilar
TRADUCCION OFICIAL No. 05 / 2-124
JUAN PABLO PIEDRAHÍTA AGUILAR
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. 718 DE MAYO 2003
DEL MIN. INTERIOR Y DE JUSTICIA
SECRETARÍA DE JUSTICIA
CALLE 19 N° 144-0005



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

IN DE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2005 MAY -4 P 1: 46
Los
Jefe DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

160485
Juan Pineda
ESTA FOLIA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by: Jill Marcotte
3. acting in the capacity of: Notary Public
4. bears the seal/stamp of:
the State of Massachusetts, whose commission expires on February 6, 2009

Certified

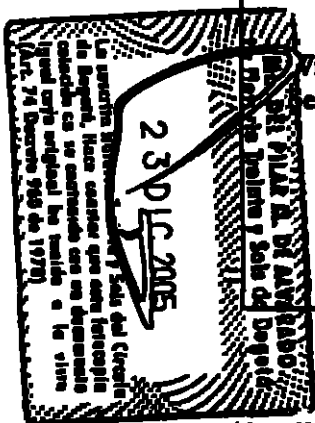
5. at: Boston, Massachusetts
6. the: 22 April, 2005
7. by: the Secretary of the Commonwealth
8. No.: 1063285
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

10. Signature:

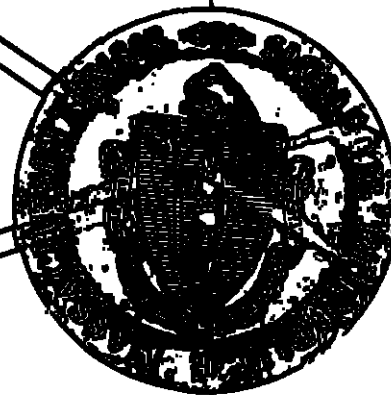
William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



prepared by *TCoughlin*

TRADUCCION OFICIAL 05/214
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUIRRE
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
DES. 21 DE MAYO 2005
DEL MIN. INTERIOR Y DE JUSTICIA



COLOMBIA

Carrera 11 n° 93-43, Of. 404 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6350813-Fax: (57 1) 6350824-E-mail: claridemotet@clartemotet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

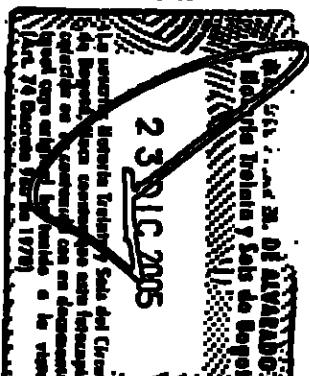
y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y apellidos comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia defiscal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(s) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelados y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de



POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned M. Andres Ryan
(name)legal representative(s) of WYETHan organization existing under the laws of Delawareand in present execution of its business activity, domiciled at
5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 USA

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, Identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, Identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, plant varieties, Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contencioso-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the above mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such institutions.

Granted and signed at Cambridge, MAon this 21st day of March of 2005BY: M. Andres Ryan
Print / signatureName: M. Andres Ryan
Title: Assistant Secretary

CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____ de _____
el Notario que suscribe DA FE de que:1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó de su puño
y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____
de la persona jurídica _____4. La citada persona jurídica con sede en _____ está legalmente
constituida, que tiene actualmente
existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este
poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que
esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque
he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe
autenticar la firma del Notario Público.**CERTIFICADO NOTARIAL** (Cuando el solicitante es
INDIVIDUO)A los _____ días del mes de _____ de _____
el Notario que suscribe DA FE de que:1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó en su presencia
el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está
legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe
autenticar la firma del Notario Público.Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante
quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia
1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actual-
mente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan
el poder están facultadas para hacerlo, dejando
constancia al mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acreditan
tales circunstancias.LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA
O APOSTILLATRADUCCIÓN OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. 718 DE MAYO 2003
INTERIOR Y DE JUSTICIA**NOTARIAL CERTIFICATE**

(When the applicant is a CORPORATION)

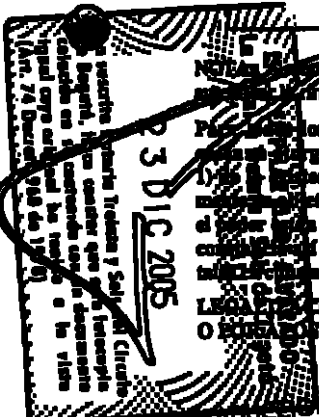
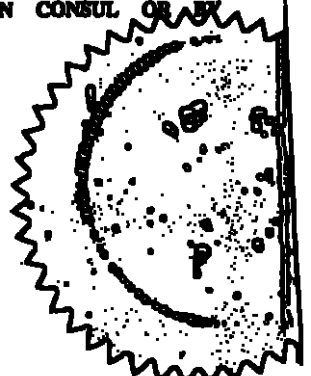
(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 21st day of March, 2005
the undersigned Notary CERTIFIES that:1. M. Andrea Ryan
(name of the person who signs the power of attorney)of legal age and Massachusetts domiciled
in Massachusetts set his hand on
the foregoing document.2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to
execute the document.3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity
of Assistant Secretary
of the juridical person Wyeth4. The mentioned juridical person with place of business
in Cambridge, MA
is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for
which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate
purposes.5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her
representation is legal and that he/she is empowered to grant this power
of attorney.6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents
which for each purpose were exhibited to me.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary
Public.**NOTARIAL CERTIFICATE** (When the applicant is an
INDIVIDUALS)On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)of legal age and domiciled at _____
_____ signed in his presence the foregoing
document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal
capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary
Public.For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted
must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation,
2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that
the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered
to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those
circumstances were exhibited to him.LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY
APOSTILLEJILL MARCOTTE
NOTARY PUBLIC
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
MY COMMISSION EXPIRES
FEBRUARY 6, 2009

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 December 2004 (23.12.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/111089 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/755

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Forris,
Glovsky and Popoo, P.C., One Financial Center, Boston,
MA 02111 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/019057

(22) International Filing Date: 14 June 2004 (14.06.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60477,525 / 11 June 2003 (11.06.2003) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AI, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60477,525 (CIP)
Filed on 11 June 2003 (11.06.2003)

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA
02140 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SHAW, Gray
[US/US]; 8 Lancaster Lane, Milton, MA 01286 (US);
SAKO, Dianne, S. [US/US]; 14 Mystic Street, Medford,
MA 02155 (US); KUMAR, Ravindra [US/US]; 421 Ar-
lington Street, Acton, MA 01720 (US); XU, Jin [CN/US];
47 Kelly Road, Dracut, MA 01826 (US).

Published:

without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Gidi-
am: Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PLATELET GLYCOPROTEIN IB ALPHA VARIANT FUSION POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE
TIBREOF

(57) Abstract: The present invention provides compositions and methods for treating or preventing vascular-associated disorders.

WO 2004/111089 A2

12

5

PLATELET GLYCOPROTEIN IB ALPHA VARIANT FUSION POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE THEREOF

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

The deleterious effects of vascular-associated disorders such as stroke, heart attack, and atherosclerosis are thought to be caused, at least in part, by the inappropriate triggering of a vascular inflammation and repair response. The vascular inflammation and repair response involves adhesive interactions between various cell types normally found freely circulating in blood. Examples of such interactions include those that can occur between platelets, leukocytes and the inner wall of blood vessels (*i.e.*, the vascular endothelium). Under conditions of high fluid shear forces, platelets adhere to the endothelium via an interaction between the glycoprotein (GP) Ib-IX-V complex on their surface and von Willebrand factor (vWF) present on exposed vessel subendothelium. In addition, platelets adhering to the vascular endothelium can bind and capture freely circulating platelets via vWF-mediated tethering, enabling thrombus growth through successive layers of platelets. The GPIIb/IIIa chain of the GPIb-IX-V complex can also facilitate the binding of α -thrombin to the platelet surface, enhancing the thrombin-mediated cleavage of GPV and protease-activated receptors (PARs).

25 In contrast, leukocytes can adhere to activated endothelium either directly, or indirectly by first adhering to vWF-immobilized platelets. In both instances, leukocyte cell surface molecules that bind to either the selectin or integrin classes of adhesion receptors mediate these adhesion events. Leukocyte-platelet adhesion is thought to occur, in part, via interaction of the leukocyte surface integrin molecule Mac1 and the GPIb component of the platelet surface GPIb-IX-V complex.

In response to vascular disturbances such as atherosclerotic plaque rupture or mechanical injury, *e.g.*, such as that caused by angioplasty, stent placement, cardiopulmonary bypass procedures, ischemic damage or stenosis, leukocytes and platelets can accumulate at a vascular lesion site and provide multiple adhesive substrates for one another. This accumulation of leukocytes and platelets leads to the local production of factors including, *e.g.*, mitogens, cytokines and chemokines, causing the further undesirable progression of a vascular disease.

Therapeutic polypeptides including a vWF-binding region derived from GPIIb α have been described. One such polypeptide is based on a sequence containing two amino acid substitutions (G233V M239V) in the amino acid sequence of wild-type human GPIIb α . An Ig fusion protein containing 290 amino acids of the extracellular, vWF-binding domain of this variant (named GPIIb2V-Ig) of this variant inhibits coronary artery thrombosis.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides improved glycoprotein-Ib α variant polypeptides that are useful as therapeutic agents for treating vascular disorders. In various embodiments, the variants show decreased aggregation, enhanced stability, decreased binding to thrombin, or two or more of these properties. One use for the glycoprotein-Ib α -protein variant polypeptides is as a fusion protein to treat vascular conditions associated with vascular inflammation, thrombosis, atherosclerosis, and angioplasty-related restenosis.

In one aspect, the polypeptide binds with lower affinity to alpha thrombin relative to binding to alpha thrombin of a polypeptide that includes the naturally occurring amino acid sequence of human GPIIb α (SEQ ID NO:1) or a polypeptide, termed GPIIb2V (SEQ ID NO:2), which includes the amino acid substitutions G233V and M239V relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1. When the polypeptide binds with low affinity to thrombin, more thrombin is made available for thrombus formation, and undesirable bleeding in a subject is minimized. Examples of polypeptides that show reduced thrombin binding are polypeptides that include one, two, or three of the amino acid substitutions Y276F, Y278F, Y279V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

In some embodiments, aggregation of the polypeptide is lowered relative to aggregation of a polypeptide that includes the amino acid sequence of human SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. In

13
some embodiments, decreased aggregation is observed during synthesis of the polypeptide in a cell. An example of a polypeptide that shows decreased aggregation is a polypeptide that includes the amino acid substitution C65S, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

5 In some embodiments, the polypeptide is more resistant to proteolysis than a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. An example of such a polypeptide is a polypeptide includes the amino acid substitution K237V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

Examples of suitable polypeptides are those that have the following amino acid sequence
10 substitutions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2: Y276F, Y276F K237V, Y276F C65S, Y276F Y278F Y279F, Y276F Y278F Y279F K237V and Y276F Y278F Y279F K237V C65S.

The polypeptides of the invention can be provided as fusion proteins. For example, the glycoprotein Iba fusion protein can include a first polypeptide, comprising at least a region of a
15 glycoprotein Iba polypeptide variant, linked to a second polypeptide. In some embodiments, the second polypeptide forms a multimer, e.g., a dimer. In some embodiments, the second polypeptide includes at least a region of an immunoglobulin polypeptide.

Also provided by the invention is a nucleic acid encoding the glycoprotein-Iba variant polypeptide, as well as vectors, cells and methods of expressing the glycoprotein-Iba variant
20 polypeptide using glycoprotein-Iba variant polypeptide-encoding nucleic acids. The invention additionally includes a nucleic acid encoding a glycoprotein Iba variant fusion polypeptide, as well as a vector containing glycoprotein Iba fusion polypeptide-encoding nucleic acids described herein, and a cell containing the vectors or nucleic acids described herein.

Also provided by the invention is a method of inhibiting leukocyte adhesion to a biological
25 tissue by contacting a leukocyte with a glycoprotein Iba fusion polypeptide. The leukocyte is contacted in an amount sufficient to inhibit adherence of the leukocyte and the biological tissue

In another aspect, the invention provides a method of treating a disorder associated with platelet activation. The method includes administering to a subject an effective amount of a glycoprotein Iba fusion polypeptide.

Also included in the invention are pharmaceutical compositions that include glycoprotein Iba variant polypeptides, or glycoprotein Iba variant fusion polypeptides.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

5 Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be
10 limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims.

15 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a graph showing inhibition of GPIIb chimera on ristocetin-induced human platelet aggregation. Shown is light transmittance (y-axis) for wild-type GPIIb ("Normal"), and GPIIb-Ig WT, GPIIb-290/2V-Ig, GPIIb-290/2V/FFF-Ig chimerae.

FIG. 2 is a graph showing the antithrombotic efficacy of GPIIb chimerae in a canine
20 Folts' model of coronary thrombosis (y-axis: LCX blood).

FIG. 3 is a graph showing inhibition of platelet function by GPIIb/290/2V-Ig and GPIIb/290/2V/FFF-Ig in a canine model of coronary thrombosis assessed by PFA-100.

25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Glycoprotein Iba-derived polypeptides with decreased binding to alpha thrombin, decreased aggregation and/or increased resistance to proteolysis according to the invention are useful as therapeutic agents in, e.g., treating various conditions that benefit by inhibiting binding of activated

platelet cells to vWF on vascular cells. In some embodiments, the polypeptides are provided as fusion proteins.

The protein variants of the invention with decreased thrombin binding advantageously result in decreased bleeding. Binding of thrombin to the platelet GPIb α receptor is necessary for clotting.

- 5 Thrombin binding to a therapeutic soluble GPIb can augment bleeding *in vivo* by sequestering thrombin away from the platelet GPIb α receptor, thus reducing thrombin-induced platelet aggregation. Thus, the protein variants that show lower affinity for thrombin make the thrombin available to interact with the platelet IB α receptor, which in turn promotes clotting.

- A suitable polypeptide includes an amino acid sequence with one to 15 amino acid
10 substitutions, deletions or insertions relative to amino acids in the region between, and including, amino acids 65-279 of a naturally occurring human GPIb α protein sequence shown in SEQ ID NO:1, below, or of the variant GPIb2V, whose amino acid sequence is shown in SEQ ID NO:2, below. In one or more embodiments, the polypeptide has one or more of the following activities: (i) lower affinity binding to alpha thrombin relative to binding to alpha thrombin of a polypeptide that
15 includes the amino acid sequence of human SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; (ii) lower aggregation relative to aggregation of a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2; or (iii) increased resistance to proteolysis relative to a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

- While not wishing to be bound by theory, it is believed that these properties are based on the
20 results of substitutions at targeted regions in the polypeptide sequence of the GPIb2V variant (SEQ ID NO:2). The change from cysteine to serine residue at position 65 (i.e., C65S) leads to inhibition of aggregation of the GPIb α molecule, in particular during a recombinant production process. The tyrosine residues found at positions 276, 278, and 279 in the wild-type sequence are normally posttranslationally modified to sulfotyrosine, which creates an anionic electrostatic interaction with
25 alpha thrombin. Selective elimination of these tyrosine residues by converting them to phenylalanine (i.e., Y276F, Y278F, and Y279F substitutions) reduces binding to alpha thrombin (Marchese et al., J. Biol. Chem. 270:9571-78), while retaining the desired binding to vWF. A lysine to valine substitution at position 237 will prevent proteolysis at this site during the recombinant production process.

A 290 amino acid sequence fragment of a naturally occurring human glycoprotein Iba chain is set forth below:

5 HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATIMPYTRLTQINLDRCEL
TKLQVDGTL PVLGTL DLSHNQLQSLPLL GQTLPALTVLDV SFNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGN
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTEL PAGLLNGLENLDTLL LQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
LHGNPWL CNCEILYFRWLQDNAENVYVWKQGV DVKAMTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLG
DEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVR (SEQ ID NO:1)

10 The amino acid sequence of the GPIb2V variant is provided below as SEQ ID NO:2. This
variant is also discussed in US patent application publication number 20030091576, and its
counterpart WO 02/063003.

15 HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATIMPYTRLTQINLDRCEL
TKLQVDGTL PVLGTL DLSHNQLQSLPLL GQTLPALTVLDV SFNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGN
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTEL PAGLLNGLENLDTLL LQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
LHGNPWL CNCEILYFRWLQDNAENVYVWKQGV DVKAVTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLG
DEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVR (SEQ ID NO:2)

20 In some embodiments, the polypeptide has no more than 12 substitutions, insertions, or
deletions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. For example, it
may have 10, 8, 7, 6, 5 or fewer substitutions, insertions, or deletions relative to the amino acid
sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. In some embodiments, the substitutions, insertions, or
deletions are in the region between amino acids 65 and 279, inclusive.

25 In some embodiments, the polypeptide binds with lower affinity to alpha thrombin relative to
binding to alpha thrombin of a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1
or SEQ ID NO:2. Examples of polypeptides that show reduced binding are polypeptides that include
one, two, or three of the amino acid substitutions Y276F, Y278F, Y279V, or a conservative variant
thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

30 In some embodiments aggregation of the polypeptide is lowered relative to aggregation of a
polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. In some
embodiments, decreased aggregation is observed during synthesis of the polypeptide in a cell. An
example of a polypeptide that shows decreased aggregation is a polypeptide that includes the amino
acid substitution C65S, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ
ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

5/6

In some embodiments, the polypeptide is more resistant to proteolysis than a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. An example of such a polypeptide is a polypeptide includes the amino acid substitution K237V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

- 5 In some embodiments, the polypeptide includes an amino acid sequence with one to 10 amino acid substitutions, insertions, or deletions relative to amino acids 1-290 of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, provided that at least one of the amino acid substitutions is C65S, K237V, Y276F Y278F, Y279F, K237V.

- 10 Examples of suitable polypeptides are those that have the following amino acid sequences substitutions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2: Y276F, Y276F K237V, Y276F C65S, Y276F Y278F Y279F, Y276F Y278F Y279F K237V and Y276F Y278F Y279F K237V C65S.

- The invention also includes polypeptides with one or more, e.g., 2, 3, 5, 6, 8, 10, 15 or more amino acid substitutions in polypeptides derived from glycoprotein IB α sequences in addition to
15 those corresponding to SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2. These include, e.g., GPIb302 (SEQ ID NO:3), GPIb302/2A (SEQ ID NO:4) GPIb4X (SEQ ID NO:5), and GPIb290/1A (SEQ ID NO:6).

- 20 HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD T T I L H L S E N L L Y T F S L A T I M P Y T R L T Q L N L D R C E L
TKLQVDGTL PVLGTL D L S H N Q L Q S L P L L G Q T L P A L T V L D V S F N R L T S L P L G A L R G L G E L Q E L Y L K G N
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPA G L L N G L E N L D T L L L Q E N S L Y T I P K G F F G S H L L P F A F
LHGNPWLNCCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV D V K A M T S N V A S V Q C D N S D K F P V Y K Y P G K G C P T L G
DEGDTDL Y D Y P E E D T E G D K V R A T R T V V K F P T K A (SEQ ID NO:3)

- 25 HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD T T I L H L S E N L L Y T F S L A T I M P Y T R L T Q L N L D R C E L
TKLQVDGTL PVLGTL D L S H N Q L Q S L P L L G Q T L P A L T V L D V S F N R L T S L P L G A L R G L G E L Q E L Y L K G N
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPA G L L N G L E N L D T L L L Q E N S L Y T I P K G F F G S H L L P F A F
LHGNPWLNCCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV D V K A M T S N V A S V Q C D N S D K F P V Y K Y P G K G C P T L G
DEGDTDL Y D Y P E E D T E G D K V A A T A T V V K F P T K A (SEQ ID NO:4)

- 30 HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD T T I L H L S E N L L Y T F S L A T I M P Y T R L T Q L N L D R C E L
TKLQVDGTL PVLGTL D L S H N Q L Q S L P L L G Q T L P A L T V L D V S F N R L T S L P L G A L R G L G E L Q E L Y L K G N
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPA G L L N G L E N L D T L L L Q E N S L Y T I P K G F F G S H L L P F A F
LHGNPWLNCCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV D V K A V T S N V A S V Q C D N S D K F P V Y K Y P G K G C P T L G
EGDTDL Y D Y P E E D T E G D K V A A T A T V V K F P T K A (SEQ ID NO:5)

- 35 HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD T T I L H L S E N L L Y T F S L A T I M P Y T R L T Q L N L D R C E L
TKLQVDGTL PVLGTL D L S H N Q L Q S L P L L G Q T L P A L T V L D V S F N R L T S L P L G A L R G L G E L Q E L Y L K G N

ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNLTLPAGLLNGLENLDTLLQLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
LHGNPWLNCCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGVDAAMTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLG
DEGDTLDLYDYYPEEDTEGDKVR (SEQ ID NO: 6)

5

10

QATEYEYLDYDFLPETEPPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLSENLLYTFSLAT
LMPYTRLTQLNLDRCELTKLQVDGTL PVLGTLDSLHNQLQSLPLLGQTL PALTVDVSEFNRLTSLPL
GALRGLGELQELYLKGNELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNLTLPAGLLNGLENLDTLLQLQENSL
YTI PKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLNCCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQVVDVKAVTSNVASVQCDNS
DKFPVYKYPGKGCPTLGDEGDTLDLYDYYPEEDTEGDKVR (SEQ ID NO: 7)

A glycoprotein protein variant can be provided as part of a fusion protein. For example, glycoprotein Iba protein-immunoglobulin fusion proteins are useful for inhibiting adherence of platelets and leukocytes to biological tissues, such as for example the vascular endothelium. The fusion proteins of the invention, or nucleic acids encoding these fusion proteins, can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject to inhibit an interaction between an glycoprotein Iba ligand (such as von Willebrand Factor, Mac-1, P-selectin or thrombin) and an glycoprotein Iba protein on the surface of a cell, such as a platelet. Inhibition of binding suppresses glycoprotein Iba protein-mediated platelet aggregation and associated signal transduction *in vivo*.

The glycoprotein Iba protein-immunoglobulin fusion proteins can be used to modulate the bioavailability of a glycoprotein Iba protein cognate ligand. Inhibition of the glycoprotein Iba protein ligand/glycoprotein Iba protein interaction are useful therapeutically for, *inter alia*, the treatment of vascular inflammation and other vascular disorders associated with platelet activation.

Glycoprotein Variant Iba Fusion Polypeptides

In various aspects the invention provides fusion proteins that include a first polypeptide containing at least a portion of a glycoprotein Iba polypeptide variant operatively linked to a second polypeptide. As used herein, a glycoprotein Iba "fusion protein" or "chimeric protein" includes at least a portion of a glycoprotein Iba polypeptide variant operatively linked to a non-glycoprotein Iba polypeptide. An "glycoprotein Iba polypeptide" or "glycoprotein Iba polypeptide variant" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to at least a portion of a glycoprotein Iba polypeptide, whereas a "non-glycoprotein Iba polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein that is not substantially homologous to the

glycoprotein Iba protein, *e.g.*, a protein that is different from the glycoprotein Iba polypeptide or fragment and that is derived from the same or a different organism. Within a glycoprotein Iba fusion protein the glycoprotein Iba polypeptide can correspond to all or a portion of an Iba protein.

5 In one embodiment, a glycoprotein Iba fusion protein comprises at least one biologically active portion of a glycoprotein Iba protein. In another embodiment, a glycoprotein Iba fusion protein comprises at least two biologically active portions of a glycoprotein Iba protein. In yet another embodiment, a glycoprotein Iba fusion protein comprises at least three biologically active portions of a glycoprotein Iba protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the first and second polypeptides are linked in a manner that allows for at least one function associated with a glycoprotein Iba polypeptide. When used to refer to nucleic acids encoding a glycoprotein Iba fusion polypeptide, the term operatively linked means that a nucleic acid encoding the glycoprotein Iba polypeptide and the non-glycoprotein Iba polypeptide are fused in-frame to each other. The non-glycoprotein Iba polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the glycoprotein Iba polypeptide.

15 In a further embodiment, the glycoprotein Iba fusion protein may be linked to one or more additional moieties. For example, the glycoprotein Iba fusion protein may additionally be linked to a GST fusion protein in which the glycoprotein Iba fusion protein sequences are fused to the C-terminus of the GST (*i.e.*, glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of glycoprotein Iba fusion protein.

20 In another embodiment, the fusion protein includes a heterologous signal sequence (*i.e.*, a polypeptide sequence that is not present in a polypeptide encoded by a glycoprotein Iba nucleic acid) at its N-terminus. For example, the native glycoprotein Iba signal sequence can be removed and replaced with a signal sequence from another protein. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of glycoprotein Iba can be increased through use of a
25 heterologous signal sequence. A representative signal sequence is MPLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:8). Another representative signal sequence is MPLQLLLLLL LGPGNSLQL WDTWADEAEK ALGPLLARDRR . (SEQ ID NO:9). If desired, one or more amino acids can additionally be inserted between the first polypeptide moiety comprising the GP Iba moiety and the second polypeptide moiety.

An chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. Nucleic acid sequences encoding GPIIb α polypeptides, as well as the amino acid sequences of these polypeptides, from which variant GPIIb α polypeptide variants are constructed are disclosed in WO02/063003, the contents of which are incorporated herein by reference in their entirety.

For example, DNA fragments coding for the polypeptide variant sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, e.g., by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that encode a fusion moiety (e.g., an Fc region of an immunoglobulin heavy chain). A glycoprotein Iba α encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the immunoglobulin protein.

Glycoprotein Iba α fusion polypeptides may exist as oligomers, such as dimers or trimers. In some embodiments, the glycoprotein Iba α fusion polypeptide is a dimer.

In some embodiments, the GP Ib α polypeptide moiety is provided as a variant GP Ib α polypeptide having a mutation in the naturally-occurring GP Ib α sequence (wild type) that results in higher affinity (relative to the non-mutated sequence) binding of the GP Ib α polypeptide to a leukocyte cell surface molecule. For example, the mutant polypeptide may bind with higher affinity to von Willebrand factor (vWF). This increased reactivity, or hyperresponsiveness, can be assessed using low concentrations of ristocetin. Alternately, any other suitable means for determining the reactivity of the polypeptide with vWF can also be utilized to identify polypeptides which are "more" reactive with vWF, i.e. more reactive than naturally-occurring wild-type GP Iba α . Examples of GP Ib α polypeptide variants that bind with higher affinity to vWF include GP Iba α variants that include sequence alterations in the hinge region of a GP Iba α polypeptide. The hinge region is

defined as the region including residues 220 to 310 and is reported to be a major binding site for vWF within the GP Ib α polypeptide. Mutations in the hinge region include those at residue 233, which in the wild-type GP Ib α encodes glycine. An example of a suitable substitution of is one in which the glycine at position 233 is replaced with valine (i.e., G233V). A second site for mutation at the hinge region is at residue 239, which in the wild-type GP Ib α encodes methionine. A substitution of valine for methionine 239 is a representative substitution, but other amino acids can also be substituted. In addition, hinge region variants of GP Ib α polypeptides suitable for use in a fusion polypeptide of the invention have mutations at residue both positions 233 and 239. (see e.g., Dong et al., JBC 275:36 27663-27670 (2000)) Thus, the invention includes fusion proteins that have a substitution at position 239, e.g., an M239V substitution of a variant GP Ib α polypeptide. Also within the invention is a fusion protein having a substitution at position 233, e.g., G233V, and a fusion protein that includes a variant GP Ib α polypeptide with positions at both 233 and 239, e.g., a G233V and M239V substitution..

In some embodiments, the first polypeptide includes a full-length GP Ib α polypeptide. Alternatively, the first polypeptide comprise less than full-length GP Ib α polypeptide. For example the first polypeptide less than 600 amino acids in length, e.g., less than or equal to 500, 250, 150, 100, 50, or 25 amino acids in length.

In some embodiments, the second polypeptide is soluble. In some embodiments, the second polypeptide enhances the half-life, (e.g., the serum half-life) of the linked polypeptide. In some embodiments, the second polypeptide includes a sequence that facilitates association of the fusion polypeptide with a second GP Ib α polypeptide. In some embodiments, the second polypeptide includes at least a region of an immunoglobulin polypeptide. Immunoglobulin fusion polypeptide are known in the art and are described in e.g., US Patent Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; and 5,455,165.

In some embodiments, the second polypeptide comprises a full-length immunoglobulin polypeptide. Alternatively, the second polypeptide comprise less than full-length immunoglobulin polypeptide, e.g., a heavy chain, light chain, Fab, Fab₂, Fv, or Fc. For example, in some embodiments the second polypeptide includes the heavy chain of an immunoglobulin polypeptide. In further embodiments, the second polypeptide includes the Fc region of an immunoglobulin polypeptide.

In another aspect of the invention, the second polypeptide has less effector function than the effector function of a Fc region of a wild-type immunoglobulin heavy chain. Fc effector function includes for example, Fc receptor binding, complement fixation and T cell depleting activity (*see, for example*, US Patent No. 6,136,310). Methods of assaying T cell depleting activity, Fc effector
 5 function, and antibody stability are known in the art. In one embodiment the second polypeptide has low or no affinity for the Fc receptor. In an alternative embodiment, the second polypeptide has low or no affinity for complement protein C1q.

A representative second polypeptide sequence includes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10. This sequence includes a Fc region. Underlined amino acids are those that differ from the
 10 amino acid found in the corresponding position of the wild-type immunoglobulin sequence:

HTCPFCPAPEALGAPSVELFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLT¹TVL²HQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP³IEKTI⁴SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT⁵C
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK⁶TTTPVLDSDGSF⁷FLYSKLTVDKSRWQQGNV⁸FSCSVMH⁹EALHNHYTQK
 SL¹⁰SLSPGK (SEQ ID NO: 10)

The GPIb α polypeptide variants can include, in addition to the designated substituted amino acid substitution, an alternative amino acid that fulfills the same function as the designated acid. In some embodiments, the alternative amino acid is related to the designated amino acid as a conservative amino acid substitution of the indicated amino acid. A "conservative amino acid
 20 substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine,
 25 valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine).

Thus, in some embodiments, rather than replacing a tyrosine with a phenylalanine at position 276, 278, or 279 (Y276F, Y278F, or Y279F), the tyrosine residue can be replaced with tryptophan or
 30 histidine. Similarly, for the C65S variant, the cysteine may alternatively be replaced with glycine, asparagine, glutamine, threonine, or tyrosine. For the L237V substitution, the lysine may can

130

alternatively be replaced with alanine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, or tryptophan.

The invention also includes a polypeptide whose sequence that are 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% homologous to the sequence disclosed in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, provided
5 that it includes one or more of the amino acid substitutions C65S, K237V, Y276F, Y278F, Y279F, K237V. Derivatives or analogs of the nucleic acids or proteins of the invention include, but are not limited to, molecules comprising regions that are substantially homologous to the nucleic acids or proteins of the invention, in various embodiments, by at least about 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or even 99% identity (e.g., an identity of 80-99%) over a nucleic acid or amino acid sequence
10 of identical size or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art, or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to the complement of a sequence encoding the aforementioned proteins under stringent, moderately stringent, or low stringent conditions. An exemplary program is the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University
15 Research Park, Madison, WI) using the default settings, which uses the algorithm of Smith and Waterman.

Another aspect of the invention pertains to vectors (including expression vectors) containing a nucleic acid encoding glycoprotein Iba fusion polypeptides, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression
20 of glycoprotein Iba fusion polypeptides in prokaryotic or eukaryotic cells.

In another embodiment, the glycoprotein Iba fusion polypeptide expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* are known in the art.

Alternatively, glycoprotein Iba fusion polypeptide can be expressed in insect cells using
25 methods known in the art, e.g., with baculovirus expression vectors.

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific

regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art.

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively-linked to a regulatory sequence in a manner that allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule that is antisense to a glycoprotein Iba fusion polypeptide mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen that direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen that direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced.

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, glycoprotein Iba fusion polypeptides can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as human, Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques.

Mammalian host cell, such as a Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells can be transfected with expression vectors to enable, via posttranslational modification, the generation of the sialyl Lewis^x epitope on the N-linked and O-linked glycans of glycoprotein Iba fusion polypeptides. In the case of CHO cells this requires the co-expression of an α -1,3/1,4 fucosyltransferase (Kukowska-Latallo et al., *Genes Dev.* 4:1288-303, 1990) and Core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase enzymes. (Kumar et al., *Blood* 88:3872-79, 1996). The presence of the sialyl Lewis^x epitopes on the N-linked and O-linked glycans of glycoprotein Iba fusion polypeptides will enhance the binding to selectins.

For stable transfection of mammalian cells, it is known that, depending upon the expression vector and transfection technique used, only a small fraction of cells may integrate the foreign DNA

into their genome. In order to identify and select these integrants, a gene that encodes a selectable marker (e.g., resistance to antibiotics) is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Various selectable markers include those that confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin and methotrexate. Nucleic acid encoding a selectable marker can be introduced into a host cell on the same vector as that encoding glycoprotein Iba fusion polypeptides or can be introduced on a separate vector. Cells stably transfected with the introduced nucleic acid can be identified by drug selection (e.g., cells that have incorporated the selectable marker gene will survive, while the other cells die).

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) glycoprotein Iba fusion polypeptides. Accordingly, the invention further provides methods for producing glycoprotein Iba fusion polypeptides using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding glycoprotein Iba fusion polypeptides has been introduced) in a suitable medium such that glycoprotein Iba fusion polypeptides is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating glycoprotein Iba fusion polypeptide from the medium or the host cell.

The fusion polypeptides may be isolated and purified in accordance with conventional conditions, such as extraction, precipitation, chromatography, affinity chromatography, electrophoresis or the like.

Chemical synthesis of polypeptides facilitates the incorporation of modified or unnatural amino acids, including D-amino acids and other small organic molecules. Replacement of one or more L-amino acids in a peptide with the corresponding D-amino acid isoforms can be used to increase the resistance of peptides to enzymatic hydrolysis, and to enhance one or more properties of biologically active peptides, *i.e.*, receptor binding, functional potency or duration of action.

Introduction of covalent cross-links into a peptide sequence can conformationally and topographically constrain the polypeptide backbone. This strategy can be used to develop peptide analogs of the fusion polypeptides with increased potency, selectivity and stability. Because the conformational entropy of a cyclic peptide is lower than its linear counterpart, adoption of a specific conformation may occur with a smaller decrease in entropy for a cyclic analog than for an acyclic analog, thereby making the free energy for binding more favorable. Macrocyclization is often

accomplished by forming an amide bond between the peptide N- and C-termini, between a side chain and the N- or C-terminus [e.g., with $K_3Fe(CN)_6$ at pH 8.5], or between two amino acid side chains. Disulfide bridges are also introduced into linear sequences to reduce their flexibility. Furthermore, the replacement of cysteine residues with penicillamine (Pen, 3-mercapto-(D) valine) has been used to increase the selectivity of some opioid-receptor interactions.

Pharmaceutical Compositions Including Glycoprotein Iba Fusion Polypeptides or Nucleic Acids Encoding Same

The glycoprotein Iba fusion proteins, or nucleic acid molecules encoding these fusion proteins, (also referred to herein as "Therapeutics" or "active compounds") of the invention, and derivatives, fragments, analogs and homologs thereof, can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Suitable carriers are described in the most recent edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, a standard reference text in the field, which is incorporated herein by reference. Examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, finger's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

The active agents disclosed herein can also be formulated as liposomes. Liposomes are prepared by methods known in the art. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (*i.e.*, topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, isotonic agents can be included in the composition, for example, sugars, polyalcohols such as manitol and sorbitol; and sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*e.g.*, a glycoprotein Iba fusion protein) in the required amount in an appropriate solvent with one or a

combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization.

Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above.

In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of

- 5 preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic

administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of

- 10 tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and

expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can

contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as

- 15 microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray

- 20 from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For

transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example,

- 25 for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional

- 30 suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art.

In some embodiments, oral or parenteral compositions are formulated in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration or by stereotactic injection. The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that produce the gene delivery system.

Sustained-release preparations can be prepared, if desired. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides, copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers

such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods.

- 5 The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

METHODS OF INHIBITING ADHERENCE OF IN A BIOLOGICAL SYSTEM

- Included in the invention is a method of inhibiting adherence of a blood cell to a biological tissue in a biological system. The method includes adding to a biological system a fusion
10 polypeptide of the invention in an amount sufficient to inhibit adherence of a blood cell to the biological tissue.

- The blood cell can be for example, a leukocyte, platelet or red blood cell. The leukocyte can be any leukocyte that is capable of adhering to a biological tissue. In various aspects the leukocyte is a granulocyte, (*i.e.*, neutrophil, basophil or eosinophil), monocyte (*i.e.*, macrophage) or lymphocyte
15 (*e.g.*, T-lymphocyte, B-lymphocyte, tumor infiltrating lymphocytes or natural killer cell). In some embodiments, the leukocytes express a $\beta 2$ integrin, *e.g.* Mac-1. Alternately, the leukocyte expresses a selectin ligand.

- Also included in the inventions are methods of inhibiting adherence of a protein to a biological tissue in a biological system. The method includes adding to a biological system a fusion
20 polypeptide of the invention in an amount sufficient to inhibit adherence of the protein to the biological tissue.

 The protein can be membrane associated (*e.g.*, covalently, non-covalently, or ionic). Alternatively, the protein can be in a soluble form (*i.e.*, in solution). The protein is von Willebrand Factor, thrombin, P-selectin or glycoprotein Iba.

- 25 As used herein a biological system is meant to include any system that comprises biological components, *e.g.*, cells, proteins, carbohydrates, lipids or nucleic acids. The biological system can be an *in vivo*, *ex vivo* or *in vitro* system.

"Adherence" is meant to include any biological interaction of a leukocyte, *e.g.*, rolling, firm attachments or specific interaction.

Inhibition of adherence of a blood cell or protein to a biological tissue can be measured using methods known in the art. For example, assays for detecting binding of glycoprotein Ib α to a biological tissue are described in Simon et al., J. Exp. Med. 192:193-204, 2000, and references cited therein. In various embodiments, binding of a GP Ib α fusion protein inhibits binding of a blood cell or protein to a biological tissue by at least 30%, 50%, 75%, 90%, 95%, 99% or 99.9%.

Adherence can also be assessed in condition of greater or less than physiological flow conditions, including static conditions and serial application of static and shear conditions.

Adherence can be determined for example colorimetrically, fluorometrically, by flow cytometry or using a parallel plate flow chamber assay.

Also included in the invention are methods of treating platelet activation associated disorders in a subject by administering to a subject a biologically-active therapeutic compound (hereinafter "Therapeutic"). Alternatively, the subject is also administered one or more of the following: a statin; acetylsalicylic acid (aspirin); heparin (including unfractionated or low-molecular weight heparins); glycoprotein IIb/IIIa antagonists; clopidogrel; P-selectin antagonists; thrombin inhibitors; and thrombolytic enzymes.

The subject can be *e.g.*, any mammal, *e.g.*, a human, a primate, mouse, rat, dog, cat, cow, horse, pig.

The therapeutics include, *e.g.*: (i) any one or more of the glycoprotein Ib α polypeptide and derivative, fragments, analogs and homologs thereof; (ii) antibodies directed against the glycoprotein Ib α polypeptides described in (i) and (iii) nucleic acids encoding a glycoprotein Ib α polypeptide, and derivatives, fragments, analogs and homologs thereof as described in (i) above.

Essentially any disorder that is etiologically linked to platelet activation is considered amenable to prevention or to treatment. The disorder can be, *e.g.*, vascular inflammation; atherosclerosis; restenosis (*e.g.*, angioplasty-related restenosis); and/or a condition associated with thrombotic disease, *e.g.*, angina, (including stable angina and unstable angina) acute myocardial infarction, stroke, venous thrombosis or arterial thrombosis.

The invention will be further illustrated in the following non-limiting examples.

Example 1. GPIb-Ig tyrosine sulfation plays an important role in thrombin binding but is less important for vWF binding

The role of the acidic carboxyl terminal region of GPIb α in binding to vWF and thrombin was examined by tyrosine residues at positions 276, 278, and/or 279 of three types of GPIb α -IgG₁Fc fusion proteins: those with a wild-type human GPIb α sequence; a fusion protein with the M239V (1V) substitution, and a fusion protein with a double G233V M239V (2V) substitution. The proteins were produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, then isolated by Protein A affinity chromatography and anion exchange chromatography. Dimerized forms of the fusion proteins in which the sulfation state varied from 0 to 6 were isolated.

Binding of the isoforms to the vWF A1 domain (A1), to intact vWF, and to α -thrombin was examined using surface plasmon resonance (BiaCore).

The 1V and 2V polypeptides bound with significantly higher affinity to the A1 domain as compared to the WT polypeptides. The 1V and 2V polypeptides also showed significantly enhanced affinity for intact vWF relative to the affinity of the fusion protein with the wild-type

GPIb α sequence for vWF. The K_d for the 2V variant ranged from 4 nM to 12 nM, and the K_d for the 1V variant ranged from 119 nM to 284 nM for fully sulfated to non-sulfated isoforms. Binding of wild-type GPIb α to vWF was not detected under the same conditions, which indicates a $K_d > 1$ mM. Varying the sulfation state in WT, 1V, and 2V did not correlate with a significant change in binding to A1 domain or intact vWF. Finally, the GPIb α -Ig-vWF interaction exhibited slow-on/slow-off kinetics typical of a hydrophobic interaction (K_a and $K_d \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $\sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectively).

For GP Ib α -Ig239V and GP Ib-Ig2V molecules, the binding affinity of the fully sulfated isoform to thrombin was ~ 80 -fold higher than that of the unsulfated isoform (K_D of 0.5 μM and 40 μM , respectively). For vWF binding, the fully sulfated molecules were only 3-4 fold more active than the unsulfated forms of both mutants ($K_D = 3.4 - 15$ nM for 2V 6-0 sulfated, 113 - 521 nM for 1V 6-0 sulfated). The relationship between sulfation state and binding to von Willebrand Factor and binding to thrombin was also examined.

Rat tail bleeding method: Adult male Sprague Dawley rats (Taconic), weighing 250-300gm, were used. The animals were equipped with a jugular vein catheter by the vendor before arriving. The animals were housed in individual cages at room temperature under a light period of 12hr (6:am

-6:pm) at our institutional animal facility and were provided standard laboratory rodent chow and water *ad libitum*. The animals were acclimated to their new environment at least three days before the use.

GPIb-Ig sample administration and rat Tail vein bleeding procedures: On the day of the experiment, an extension tubing (20 cm of PE 50 tubing) with a 3-way stopcock and a 1-cc syringe filled with sterile isotonic 0.9% saline was attached to the indwelling jugular vein catheter. Stock GPIb-Ig test sample was diluted with isotonic 0.9% saline and was administered at indicated doses in a volume of 0.1ml per 100 gm body weight via another arm of the 3-way stopcock. The catheter was flushed with 0.2 ml of saline. Ten minutes after the injection, the rats were removed from their home cage and were gently put into a restrainer. The distal 1-2 mm segment of the tail was transected using a razor blade and the tail was quickly immersed into a 300ml-beaker pre-filled with 0.9% isotonic saline (temperature 37°C). Bleeding time was defined as the period of time from the start of the tail bleeding to completely cease of bleeding (no re-bleeding within 30 second once the bleeding has stopped). At the end of the experiment, the rats were euthanized by inhalation of CO₂.

In the rat tail bleeding assay, 10 minutes following an i.v. dose of 200ug/kg, bleeding time of four minutes was detected in GPIb α variants with a sulfation state 0, 1, or 2. Bleeding time increased as the sulfation state increased to 6, where bleeding time was 10 minutes.

These data demonstrate that sulfation plays a role in thrombin binding, but a much lesser role in vWF binding. However, the sulfation state significantly affects binding to α -thrombin. The stoichiometry of GPIb α -Ig binding with thrombin was greater than 2 α -thrombin per GPIb α -Ig. The α -thrombin-GPIb α interaction is much more sensitive to the GPIb α -Ig sulfation state compared with the hydrophobicity of the Cys208-Cys249 loop of GPIb α , which binds vWF. These results indicate that the GPIb α contains two functionally distinguishable subdomains: one for vWF binding and one for thrombin binding.

25

Example 2. Cys 65 in GPIba is involved in aggregation

The crystal structure reveals that Cys65 of GPIb α is buried in the LRR region. The very low labeling ratio (about 5%) with thiol-reactive probes under native conditions demonstrated the inaccessibility of this Cys residue. Ellman's assay and preliminary native peptide mapping showed

that there was no modification on Cys65. However, even a very small amount of exposed thiol could form intermolecular disulfide bonds and caused aggregation. The role of this residue in aggregation was examined.

When GP Iba sample was stressed at 40 °C for 80 hrs, about 25% of total protein formed aggregates. The aggregates were reducible but mostly SDS stable. Analytical ultracentrifugation indicated that the aggregates ranged from dimer to octamer. Non-reduced, alkylated Achro-K peptide map of the aggregates showed that the free Cys-containing peptide (K4 peptide) disappeared in the map, which might form a large peptide with another K4 and other Cys containing peptides. To confirm the role of the free Cys in aggregation, the GP Iba sample was heat-stressed in 1 M GnHCl which resulted in total covalent aggregation. In the presence of 1M GnHCl, the protein structure is likely to be loosened, thereby exposing the buried Cys65, and accelerating the aggregation. These data suggest that under these conditions the free Cys residue can be involved in aggregation.

Example 3. GPIba fusion proteins interact with vWF polypeptide

Evidence for a direct interaction between a GPIba fusion protein variants and vWF polypeptide was examined.

The GPIba fusion protein variants tested included 1V, 2V, 3V, 3V/C65S, 2V/FFF, and a variant named "clipped 2V". Control reactions included a 290 amino acid GPIba protein, a vWF polypeptide alone or an irrelevant control polypeptide (47.mFc, a PSGL-1 fusion protein).

A fusion polypeptide or control polypeptide was mixed with Protein A Sepharose beads, which bound to the immunoglobulin moieties of the fusion protein. Protein bound to the Protein A Sepharose beads were eluted and electrophoresed through a 3-8% Tris-Acetate gel. The gel was then immunoblotted with a polyclonal antibody to vWF, and the antibody detected. Gels were run under both reducing and non-reducing conditions. The procedure was performed twice.

The results of binding to the vWF A1 fragment or to intact vWF fragment are shown below. vWF showed the strongest binding to the GPIba variants 3V and 3V/C65S when assayed under both reducing and non-reducing conditions. Strong binding was also observed with the 2V variant, while comparatively less binding was detected with the 1V variant and the 2V/FFF variant. The GPIba wild-type polypeptide showed weak binding to vWF in these experiments.

24

	1V	2V	3V	2V/FFF	3V/C-8
vWF A1 Binding Constant (K_{A_1} M^{-1})	3.6E+07	1.9E+08	1.5E+09	9.1E+07	1.5E+09
vWF Binding Constant (K_{A_2} M^{-1})	7.7E+07	5.6E+08	1.7E+09	2.4E+08	1.7E+09

Example 5: In vivo inhibition of repetitive coronary artery thrombosis

The ability of a fusion Iba protein-immunoglobulin protein to inhibit coronary artery thrombosis *in vivo* is determined using the procedure described by Folts et al., Circulation 54:365-70, 1976 is examined. The fusion protein includes a GPIIb α sequence with the substitutions Q233V K237V and M239V relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

Mongrel dogs, weighing 20-25kg, are anesthetized with sodium pentobarbital (30mg/kg i.v.), then intubated and ventilated with room air using a respirator. Venous and arterial catheters are placed. The heart is approached by left thoracotomy through the fifth intercostal space. The pericardium is opened and sutured to the wound edges to provide a cradle without displacing the heart. About 2cm of the left circumflex coronary artery (LCX) is isolated. Mean and dynamic LCX flow are continuously monitored using a perivascular ultrasonic flow probe placed proximally on the artery. After a stabilization period, the endothelium of the LCX is injured by squeezing with a hemostat. A plastic constrictor is placed distal and overlying the area of injured endothelium to provide approximately 70-80% vessel stenosis. When blood flow decreases to zero, the blood flow is restored by shaking the constrictor to dislodge aggregated platelets. This decrease and restoration of blood flow are termed CFRs. At least five consecutive CFRs are recorded prior to administering the test drug.

Increasing amounts of 3V results in higher blood flow. These results demonstrate that the fusion glycoproteins inhibit thrombosis in the animal model.

Example 6. In vivo treatment of a subject with of unstable angina (UA) or non-ST-elevated myocardial infarction (NSTEMI)

A GPIIb α -Ig variant according to the invention is administered as a fusion protein by a single intravenous bolus injection (10 mg) to a patient with unstable angina or non-ST-elevated myocardial

infarction (NSTEMI). Treatment with the variant ameliorates the UA or NSTEMI. The ristocetin induced platelet aggregation assay (RIPA) is used to monitor GPIb-Ig activity.

5 **Example 7. Comparison of bleeding times using clopidogrel and GPIba 2V or GPIba 2V /FFF variants**

10 The effect on bleeding time was examined by comparing bleeding times in rats treated with clopidogrel and GPIba 2V or two different doses of GPIba 2V/FFF, which lack thrombin binding sites.

The GPIba variant was administered intravenously two hours after administration of clopidogrel (4.3 mg/kg, po). GPIba variants tested included GPIba 2V/290/FFF GPIba 2V/290 GPIba 2V/290 GPIba 2V/290, GPIba 2V/290/FFF (100 mcg/kg), and GPIba 2V/290 (50 mcg/kg). RBT was measured 15 minutes after administration of the GPIa variant. Six or seven animals were
15 tested for each treatment.

Bleeding time increased from 8.2 minutes (N = 7) in rats treated with clopidogrel alone to 24 minutes in rats treated with clopidogrel and 50 mcg/kg of GPIba 2V/290 (N = 6). Bleeding time increased to 13.9 minutes in rats treated with 50 mcg/kg of GPIba 2V/290/FFF (N = 6), and to 19 minutes in rats treated with 100 mcg/kg of GPIba 2V/290/FFF (N = 7). Thus, a shorter bleeding
20 time was observed in animals given twice the dose of the GPIba 2V/290/FFF as compared to animals given the GPIba 2V/290 variant.

25 **Example 8. Comparison of antithrombotic efficacy of sulfated and non-sulfated forms of recombinant soluble GPIba chimeras in a canine model of coronary artery thrombosis**

The ligand binding capacity and anti-thrombotic efficacy of a non-sulfated recombinant human GPIba chimera (GPIb-290/2V/FFF-Ig) was compared to that of a sulfated recombinant human GPIba chimera (GPIb-290/2V-Ig).

30 Soluble recombinant GPIba Chimeras used included GPIb-290/2V-Ig, which consists of the N-terminal 290 amino acids of GPIba with gain-of-function valine substitutions at positions 233 and

25

239, fused to a human IgG1 Fc domain. GPIb α -290/2V/FFF-Ig was generated by further substituting three tyrosine residues (Tyr-276, 278, 279) with phenylalanines to eliminate sulfation.

Cyclic flow reductions (CFRs) were induced by crush injury of the left circumflex coronary artery in anesthetized male mongrel dogs. Coronary blood flow was continuously monitored using a perivascular ultrasonic flow probe. The template bleeding time was measured at the surface of the inner upper lip using an automated cutting device. The bleeding time prolongation caused by sulfated and non-sulfated GPIba chimeras was assessed by using rat tail bleeding model. Platelet function in whole blood before and at various time points after treatment in Folts' model was measured with a Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100).

The binding abilities of GPIb α -290/2V-Ig and GPIb α -290/2V/FFF-Ig to vWF and a-thrombin were evaluated *in vitro* using a Biacore assay. The results are presented below:

Mutant	vWFAI Binding	Thrombin Binding
GPIb wild type	266 nM	0.76 uM
GPIb-290/2V-Ig	5 nM	0.63 uM
GPIb-290/2V/FFF-Ig	15.4 nM	35.8 uM

The effect of wild-type, or GPIb chimeras on ristocetin-induced human platelet aggregation is shown in FIGS. 1A-1D. Shown are wild-type GPIba ("Normal"), GPIb-Ig WT, GPIb α -290/2V-Ig, and GPIb α -290/2V/FFF-Ig.

The dose response of GPIb-290/2V-Ig ("2V") and GPIb-290/FFF-Ig ("FFF") in a canine Folts' model of coronary thrombosis is shown below. A score of 4 was given if CFRs were completely eliminated, and a score of 3 was given if the CFRs were not completely abolished, but the coronary was able to spontaneously open.

2V (ug/kg, iv)	Response Score	BT (min)	FFF (ug/kg, iv)	Response Score	BT (min)
-------------------	-------------------	-------------	--------------------	-------------------	----------

50	4 (6/6)	2.0	50	3 (3/3)	2.4
100	4 (6/6)	3.7	100	4 (3/3)	2.3
-	-	-	200	4 (3/3)	3.1
500	4 (2/2)	10.25	500	4 (3/3)	5.4

Rat tail bleeding time prolongation caused by GPIIb-290/2V-Ig and GPIIb-290/2V/FFF-Ig was also examined:

5

2V (ug/kg, iv)	BT Mean (± SE)	N	FFF (ug/kg, iv)	BT Mean (± SE)	N
50	3.1 ± 0.6	8	100	3.3 ± 0.4	6
100	4.6 ± 0.8	8	200	4.9 ± 0.2	7
200	8.9 ± 1.1	7	500	8.7 ± 0.7	7

FIG. 2 is a graph showing the antithrombotic efficacy of GPIIb α chimeras in a canine Folts' model of coronary thrombosis (y-axis: LCX blood)

FIG. 3 is a graph showing inhibition of platelet function by GPIIb/290/2V-Ig and
10 GPIIb/290/2V/FFF-Ig in a canine model of coronary thrombosis assessed by PFA-100.

These results demonstrate that conversion of the six sulfated tyrosines to phenylalanines decreases vWF A1 domain binding by ~ 3- fold in these studies and almost completely abrogated thrombin binding. GPIIb/290/2V/FFF-Ig demonstrated a 50% decrease in potency as compared with GPIIb-290/2V-Ig in cyclic flow reduction, bleeding time prolongation and ADP closure times
15 assessed using a PFA-100. The prevention of arterial thrombus formation by GPIIb α chimeras at these doses occurs via inhibition of the vWF A1 domain, and this activity is independent of a thrombin binding.

OTHER EMBODIMENTS

While the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are

5 within the scope of the following claims.

What is claimed is:

1. A protein comprising an amino acid sequence with one to 20 amino acid substitutions, deletions or insertions relative to amino acids 1-290 of a human GPTb α protein sequence (SEQ ID NO:1), wherein said polypeptide has at least one activity selected from the group consisting of:
 - lower affinity binding to alpha thrombin relative to binding to alpha thrombin of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;
 - lower aggregation relative to aggregation of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2; and
 - increased resistance to proteolysis than a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
2. The polypeptide of claim 1, wherein said first polypeptide has no more than 15 substitutions, insertions, or deletions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.
3. The polypeptide of claim 1, wherein said first polypeptide has no more than 12 substitutions, insertions, or deletions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.
4. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide has no more than 10 substitutions, insertions, or deletions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.
5. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide has no more than 5 substitutions, insertions, or deletions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.
6. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide binds with lower affinity to

alpha thrombin relative to binding to alpha thrombin of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

7. The polypeptide of claim 6, wherein said polypeptide comprises at least one of the amino acid substitutions Y276F, Y278F, Y279V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

8. The polypeptide of claim 6, wherein said polypeptide comprises at least two of the amino acid substitutions Y276F, Y278F, Y279V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

9. The polypeptide of claim 6, wherein said polypeptide comprises the amino acid substitutions Y276F, Y278F, Y279V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

10. The polypeptide of claim 1, wherein aggregation of said polypeptide is lowered relative to aggregation of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

11. The polypeptide of claim 10, wherein said polypeptide comprises the amino acid substitution C65S, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

12. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is more resistant to proteolysis than a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

13. The polypeptide of claim 12, wherein said polypeptide comprises the amino acid substitution K237V, or a conservative variant thereof, relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

14. A polypeptide comprising an amino acid sequence with 1 to 10 amino acid substitutions, insertions, or deletions relative to amino acids 1-290 of SEQ ID NO:2, provided that said amino acid sequence includes 233V, 239V, and comprises the amino acid substitution Y276F.

5

15. The polypeptide of claim 14, wherein said amino acid sequence comprises the amino acid substitution K237V.

16. The polypeptide of claim 14, wherein said amino acid sequence further comprises the amino acid substitution C65S.

10

17. The polypeptide of claim 14, wherein said amino acid sequence further comprises the amino acid substitution Y278F or Y279F.

18. The polypeptide of claim 1, wherein said amino acid sequence further comprises the amino acid substitutions Y278F and Y279F.

15

19. The polypeptide of claim 18, further comprising the amino acid substitution K237V.

20. The polypeptide of claim 19, further comprising the amino acid substitution C65S.

20

21. The polypeptide of claim 14, wherein said polypeptide binds with higher affinity to von Willebrand factor than a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

25

22. A polypeptide comprising one or more substitutions in the amino acid sequence SEQ ID NO:2, wherein said one or more substitutions is

Y276F;

Y276F K237V;

Y276F C65S;

Y276F Y278F Y279F;

5 Y276F Y278F Y279F K237V; or

Y276F Y278F Y279F K237V C65S.

23. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of claim 1 linked to a second polypeptide.

10

24. The fusion polypeptide of claim 23, wherein said second polypeptide comprises a region of a heavy chain immunoglobulin polypeptide.

25. The fusion polypeptide of claim 24, wherein said second polypeptide comprises an Fc
15 region of an immunoglobulin heavy chain.

26. The fusion polypeptide of claim 25, wherein said second polypeptide has less effector function than the effector function of a Fc region of a wild-type immunoglobulin heavy chain.

20 27. The fusion polypeptide of claim 24, wherein said second polypeptide binds with low or no affinity to a Fc receptor.

28. The fusion polypeptide of claim 24, wherein said second polypeptide binds with low or no affinity to complement protein C1q.

25

29. The fusion polypeptide of claim 24, wherein said second polypeptide comprises a region of a heavy chain immunoglobulin polypeptide.

30. The fusion polypeptide of claim 24, wherein said second polypeptide comprises an Fc region of an immunoglobulin heavy chain.

31. The fusion polypeptide of claim 24, wherein said second polypeptide has less effector function than the effector function of a Fc region of a wild-type immunoglobulin heavy chain.

32. The fusion polypeptide of claim 24, wherein the second polypeptide comprises the sequence of SEQ ID NO:3.

33. The fusion polypeptide of claim 24, further comprising a signal sequence.

34. The fusion polypeptide of claim 33, wherein said signal sequence comprises the sequence MPLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:8) or MPLQLLLLLL LLGPGNSLQL WDTWADEAEK ALGPLLARDR R (SEQ ID NO:9).

35. A multimeric polypeptide comprising the fusion polypeptide of claim 24.

36. The multimeric polypeptide of claim 35, wherein said multimeric polypeptide is a dimer.

37. A DNA molecule encoding the polypeptide of claim 1.

38. A vector comprising the DNA of claim 37.

39. A cell comprising the vector of claim 38.

40. A method for expressing glycoprotein Iba polypeptide-immunoglobulin fusion polypeptide, the method comprising culturing the cell of claim 39 under conditions that result in expression of said glycoprotein Iba polypeptide-immunoglobulin fusion polypeptide.

5

41. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of claim 1.

42. A pharmaceutical composition comprising the fusion protein of claim 23.

10

43. A method of inhibiting adherence of a blood cell to a biological tissue in a biological system, the method comprising adding to said biological system the fusion polypeptide of claim 23 in an amount sufficient to inhibit adherence of said blood cell to said biological tissue.

44. The method of claim 43, wherein said biological system is an *in vitro* system.

15

45. The method of claim 43, wherein said biological system is an *ex vivo* system.

46. The method of claim 43, wherein said biological system is an *in vivo* system.

20

47. The method of claim 43, wherein said blood cell is a platelet.

48. The method of claim 47, wherein said platelet express glycoprotein Ib α , P-selectin or thrombin.

25

49. The method of claim 43, wherein said blood cell is a leukocyte.

50. The method of claim 49, wherein said leukocyte express Mac-1 or a selectin ligand.

51. The method of claim 49, wherein said biological tissue is complexed with von Willebrand Factor, thrombin, glycoprotein Ib α , or P-selectin.

5

52. A method of inhibiting adherence of a protein to a biological tissue in a biological system, the method comprising adding to said biological system the fusion polypeptide of claim 1 in an amount sufficient to inhibit adherence of said protein to said biological tissue.

10

53. The method of claim 52, wherein said biological system is an *in vitro* system.

54. The method of claim 52, wherein said biological system is an *ex vivo* system.

55. The method of claim 52, wherein said biological system is an *in vivo* system.

15

56. The method of claim 52, wherein said protein is membrane associated.

57. The method of claim 52, wherein said protein is glycoprotein Iba, P-selectin, von Willebrand Factor or thrombin.

20

58. The method of claim 52, wherein said protein is in solution.

59. The method of claim 58, wherein said protein is von Willebrand Factor or thrombin.

30

60. The method of claim 52, wherein said biological tissue is complexed with a protein selected from the group consisting of glycoprotein Iba, Mac-1, P-selectin, von Willebrand Factor and thrombin.

5 61. A method of treating a disorder associated with platelet activation in a subject, the method comprising administering to a subject in need thereof the fusion polypeptide of claim 1.

62. The method of claim 61, wherein said disorder is associated with thrombotic disease.

10 63. The method of claim 61, wherein said disorder is ischemic heart disease, angina, acute myocardial infarction, stroke, venous thrombosis, atherosclerosis, or arterial thrombosis.

64. The method of claim 61, wherein said disorder is angina.

15 65. The method of claim 64, wherein said angina is unstable angina.

66. The method of claim 61, wherein said subject is a human.

20 67. The method of claim 61, further comprising administering to said subject a compound selected from the group consisting of acetylsalicylic acid, heparin, a glycoprotein IIb/IIIa antagonist, clopidogrel, a P-selectin antagonist, a thrombin inhibitor and a thrombolytic enzyme.

25 68. A protein comprising an amino acid sequence with one to 20 amino acid substitutions, deletions or insertions relative to amino acids 1-290 of a human GPIIb2V protein sequence (SEQ ID NO:2), wherein said first polypeptide binds with higher affinity to von Willebrand factor than does a polypeptide comprising SEQ ID NO:2.

69. The protein of claim 68, wherein said protein is a fusion protein.

70. The protein of claim 1, wherein said protein is a fusion protein.

5 71. The fusion protein of claim 70 comprising a region of an immunoglobulin.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

13 January 2005 (13.01.2005)

Applicant's or agent's file reference

22058-583-061 (W)

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/019057

International filing date (day/month/year)

14 June 2004 (14.06.2004)

Priority date (day/month/year)

11 June 2003 (11.06.2003)

Applicant

WYETH et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
23 December 2004 (23.12.2004)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS** for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

RECEIVED

JAN 19 2005

MINTZ LEVIN BOSTON
PATENT DOCKET DEPT.☒ Data Entry☐ Docket Entry☐ Docket Cross Off☐ Previously Entered☐ No Booking Req☐ ELITE

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 40

Form PCT/IB/308(First Notice) (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

13 October 2005 (13.10.2005)

Applicant's or agent's file reference

22058-583-061

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/019057

International filing date (day/month/year)

14 June 2004 (14.06.2004)

Priority date (day/month/year)

11 June 2003 (11.06.2003)

Applicant

WYETH et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does not apply, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
23 December 2004 (23.12.2004)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

☒ Data Entry☐ Docket Entry☐ Docket Cross Off☐ Previously Entered☐ No Docketing Req☐ ELITE☐ AMENDED

Done By

[Signature]

RECEIVED

OCT 19 2005

MINTZ LEVIN, BOSTO.
PATENT DOCKET DESThe International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 40

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
23 December 2004 (23.12.2004)

Applicant's or agent's file reference
22058-583-061 W

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2004/019057

International filing date (day/month/year)
14 June 2004 (14.06.2004)

Priority date (day/month/year)
11 June 2003 (11.06.2003)

Applicant

WYETH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 23 December 2004 (23.12.2004) under No. WO 2004/111089
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
- For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

	Done By
☒ Data Entry	<u>PM</u>
☐ Docket Entry	_____
☒ Docket Cross Off	_____
☐ Previously Entered	_____
☐ No Docketing Fee	_____
☐ ELITE	_____
☐ Annuities	_____

RECEIVED

DEC 31 2004

MINTZ LEVIN, BOSTON
PATENT DOCKET DEPT

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 40

34

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> PLATELET GLYCOPROTEIN IB ALPHA VARIANT FUSION
POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 22058-583-061

<140> Not Yet Assigned

<141> 2004-06-14

<150> 60/477,525

<151> 2003-06-11

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His	Pro	Ile	Cys	Glu	Val	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Val	Asn	1	5	10	15
Cys	Asp	Lys	Arg	Asn	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	20	25	30	
Thr	Thr	Ile	Leu	His	Leu	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Leu	35	40	45	
Ala	Thr	Leu	Met	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Asp	Arg	50	55	60	
Cys	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	65	70	75	80
Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	85	90	95	
Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	100	105	110	
Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu	115	120	125	
Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu	130	135	140	
Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu	145	150	155	160
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	165	170	175	

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

<210> 2
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15
 Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60
 Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95
 Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110
 Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu

130 135 140
 Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
 180 185 190
 Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
 195 200 205
 Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
 210 215 220
 Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Val Val Asp Val Lys Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
 245 250 255
 Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
 260 265 270
 Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
 275 280 285

Val Arg
290

<210> 3
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15
 Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60
 Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110
 Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
 130 135 140
 Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
 180 185 190
 Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
 195 200 205
 Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
 210 215 220
 Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Gly Val Asp Val Lys Ala Met Thr
 225 230 235 240
 Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
 245 250 255
 Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
 260 265 270
 Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
 275 280 285
 Val Arg Ala Thr Arg Thr Val Val Lys Phe Pro Thr Lys Ala
 290 295 300

<210> 4
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15
 Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60

Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95
 Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110
 Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
 130 135 140
 Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
 180 185 190
 Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
 195 200 205
 Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
 210 215 220
 Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Gly Val Asp Val Lys Ala Met Thr
 225 230 235 240
 Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
 245 250 255
 Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
 260 265 270
 Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
 275 280 285
 Val Ala Ala Thr Ala Thr Val Val Lys Phe Pro Thr Lys Ala
 290 295 300

<210> 5

<211> 301

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp

20					25					30						
Thr	Thr	Ile	Leu	His	Leu	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Leu	
35					40					45						
Ala	Thr	Leu	Met	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Asp	Arg	
50					55					60						
Cys	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	
65					70					75					80	
Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	
85					90					95						
Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	
100					105					110						
Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu	
115					120					125						
Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu	
130					135					140						
Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu	
145					150					155					160	
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	
165					170					175						
Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ile	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe	
180					185					190						
Gly	Ser	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Pro	Trp	Leu	
195					200					205						
Cys	Asn	Cys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Ala	
210					215					220						
Glu	Asn	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Gln	Val	Val	Asp	Val	Lys	Ala	Val	Thr	
225					230					235					240	
Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Val	Gln	Cys	Asp	Asn	Ser	Asp	Lys	Phe	Pro	Val	
245					250					255						
Lys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Cys	Pro	Thr	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Thr	
260					265					270						
Asp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys	Val	
275					280					285						
Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Val	Val	Lys	Phe	Pro	Thr	Lys	Ala				
290					295					300						

<210> 6

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15
 Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60
 Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95
 Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110
 Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
 130 135 140
 Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
 165 170 175
 Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
 180 185 190
 Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
 195 200 205
 Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
 210 215 220
 Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Gly Val Asp Val Ala Ala Met Thr
 225 230 235 240
 Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
 245 250 255
 Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
 260 265 270
 Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
 275 280 285

Val Arg
290

<210> 7
<211> 307
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Glu Pro Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val
20 25 30

Asn Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys
35 40 45

Asp Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser
50 55 60

Leu Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp
65 70 75 80

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu
85 90 95

Gly Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu
100 105 110

Gly Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg
115 120 125

Leu Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln
130 135 140

Glu Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Gln Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu
145 150 155 160

Leu Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn
165 170 175

Leu Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp
180 185 190

Thr Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe
195 200 205

Phe Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp
210 215 220

Leu Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn
225 230 235 240

Ala Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Val Val Asp Val Lys Ala Val
245 250 255

38

Thr Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro
260 265 270

Val Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly
275 280 285

Asp Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp
290 295 300

Lys Val Arg
305

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:heterologous
signal sequence

<400> 8

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
1 5 10 15

<210> 9

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:heterologous
signal sequence

<400> 9

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
20 25 30

Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg
35 40

<210> 10

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 20 25 30
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 35 40 45
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 50 55 60
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 65 70 75 80
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 85 90 95
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
 100 105 110
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 115 120 125
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 165 170 175
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 180 185 190
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195 200 205
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

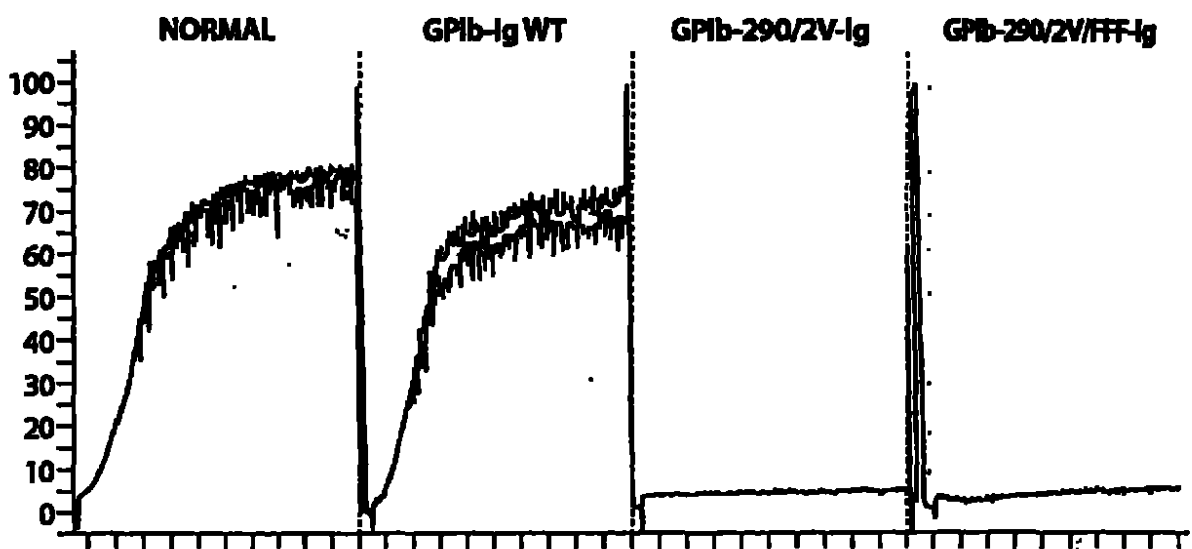


Fig. 1

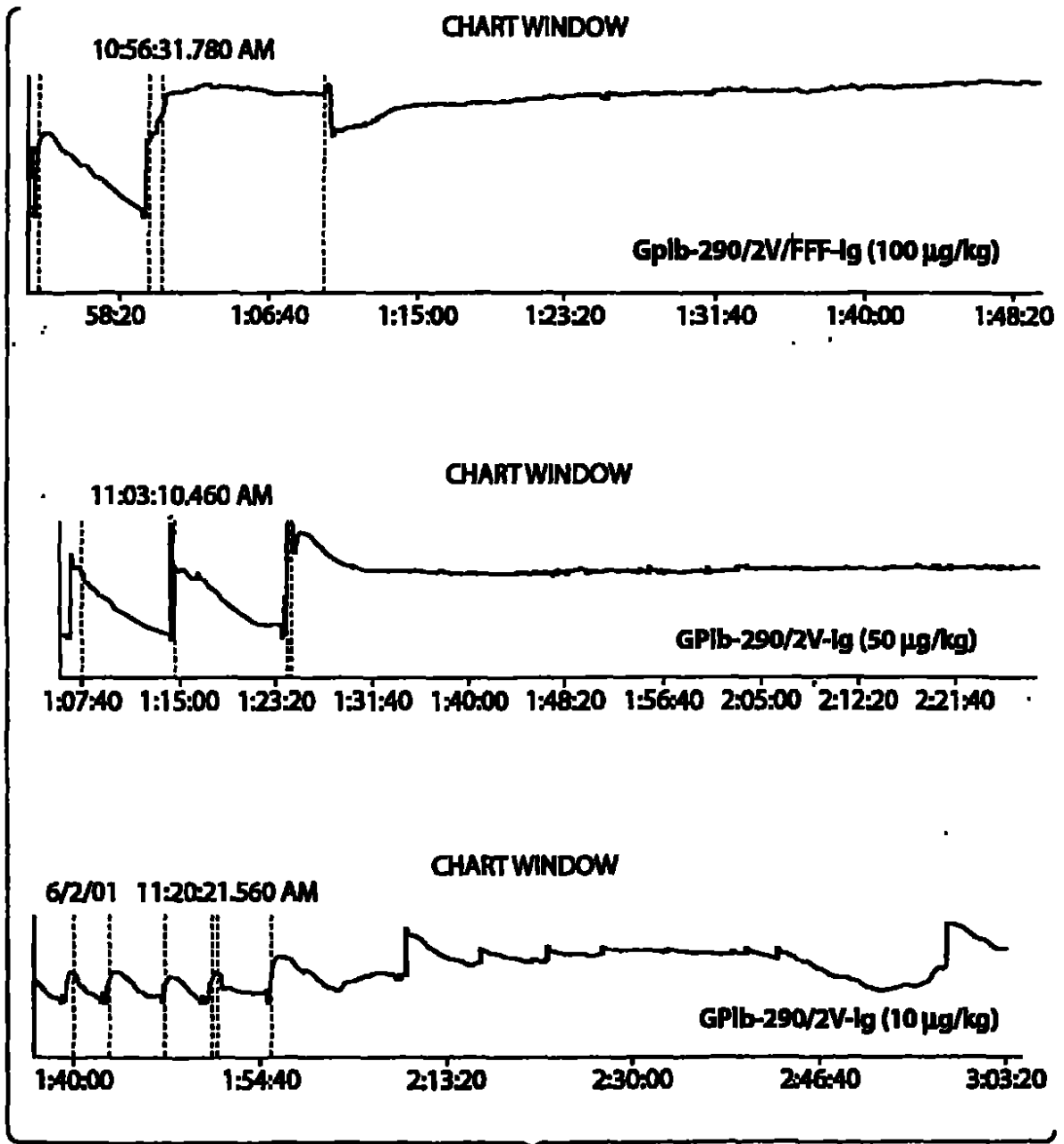


Fig. 2

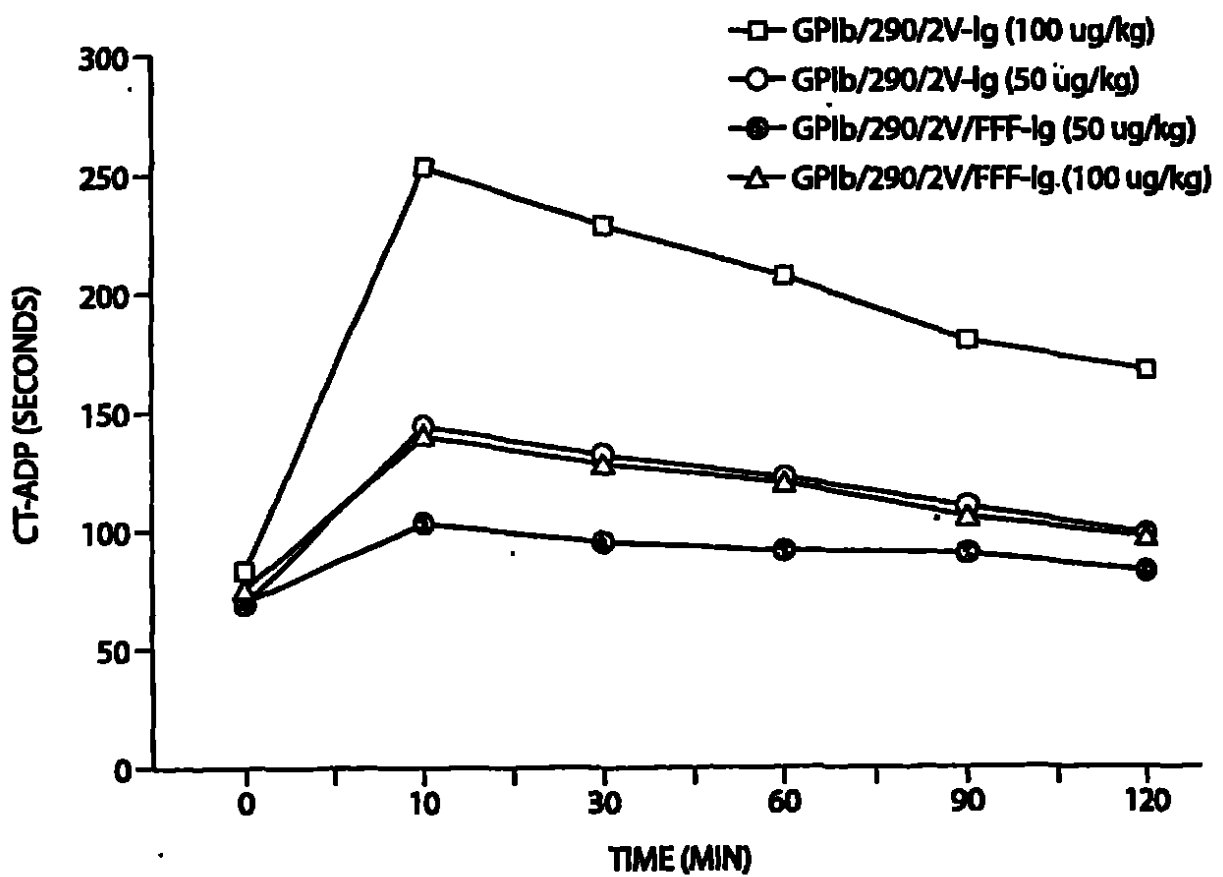


Fig. 3

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS,
GLOVSKY AND POPEO PC
Attn. Elrifsi, Ivor R.
One Financial Center
Boston, MA 02111
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year) 04/03/2005	
Applicant's or agent's file reference 22058-583-061	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2004/019057	International filing date (day/month/year) 14/06/2004
Applicant WYETH	☐ Data Entry ☒ Docket Entry ☐ Docket Cross Off ☐ Previously Entered ☐ No Docketing Req ☒ E-FILE ☐ AIRMAIL ☐ AIRTEL

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(e) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an International preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the application of the provisions of the PCT, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

RECEIVED

MAR 09 2005

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	MINTZ LEVIN, BOSTON PATENT DOCKET DEPT. Stefanie Buchler
--	--

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 16 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 18 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 22058-583-061	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/019057	International filing date (day/month/year) 14/06/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11/06/2003
Applicant WYETH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/019057

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/019057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/755 A61K38/00 C12N15/12 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/063003 A (GENETICS INSTITUTE, LLC; SHAW, GRAY, D; KUMAR, RAVINDRA; SAKO, DIANNE,) 15 August 2002 (2002-08-15) the whole document	1-71
Y	DONG J-F ET AL: "Novel gain-of-function mutations of platelet glycoprotein Iba1pha by valine mutagenesis in the Cys209-Cys248 disulfide loop: Functional analysis under static and dynamic conditions" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 275, no. 36, 8 September 2000 (2000-09-08), pages 27663-27670, XP002226663 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-5, 12, 13, 15, 19, 22-33, 35-71

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2005

Date of mailing of the international search report

04/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6616 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fac. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marinoni, J-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/019057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARCHESE PATRIZIA ET AL: "Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib-alpha with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 16, 1995, pages 9571-9578, XP002318237 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-9, 14, 17, 18, 22-33, 35-42, 61-71
Y	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2001 (2001-11-16), NI HEYU ET AL: "Intravital microscopy of injured murine arterioles demonstrates that recombinant soluble GPIb-Ig chimeras inhibit thrombus formation in vivo" XP002318238 Database accession no. PREV200200250180 abstract & BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 753a, 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001 ISSN: 0006-4971	1-71
Y	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2001 (2001-11-16), SHAW GRAY D ET AL: "A recombinant soluble Ig fusion form of human GPIbalpha inhibits platelet aggregation and recurrent coronary cyclic flow reductions in a canine model" XP002318239 Database accession no. PREV200200220561 abstract & BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 704a, 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001 ISSN: 0006-4971	1-71
A	EP 0 317 278 A (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 24 May 1989 (1989-05-24) -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/019057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 5 November 2002 (2002-11-05), KUMAR ANJALI ET AL: "A recombinant soluble form of human GPIbalpha (GPIb-Ig) inhibits platelet aggregation and coronary cyclic flow reductions in a canine model." XP009044244 Database accession no. PREV200300080165 abstract & CIRCULATION, vol. 106, no. 19 Supplement, 5 November 2002 (2002-11-05), pages II-119, ABSTRACTS FROM SCIENTIFIC SESSIONS; CHICAGO, IL, USA; NOVEMBER 17-20, 2002 ISSN: 0009-7322	
A	KENNY D ET AL: "NATURALLY OCCURRING MUTATIONS IN GLYCOPROTEIN IBALPHA THAT RESULT IN DEFECTIVE LIGAND BINDING AND SYNTHESIS OF A TRUNCATED PROTEIN" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 92, no. 1, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 175-183, XP002949514 ISSN: 0006-4971 the whole document	
A	HUIZINGA E G ET AL: "Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 297, no. 5584, 2002, pages 1176-1179, XP002226858 ISSN: 0036-8075	
P,X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2003 (2003-11-16), SHAW GRAY D ET AL: "Preclinical evaluation of recombinant soluble Ig fusion forms of GPIbalpha for use in treating acute coronary syndromes." XP002318240 Database accession no. PREV200400161655 abstract -/-	1-9,14, 17,18, 21-33, 35-42, 61-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/019057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	& BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), pages 76b-77b, 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/019057

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 43, 46-52, 55-67 partially
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 43, 46-52, 55-67 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/019057

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02063003	A	15-08-2002	CA 2437714 A1	15-08-2002
			EP 1360292 A2	12-11-2003
			HU 0303167 A2	29-12-2003
			NO 20033474 A	02-10-2003
			WO 02063003 A2	15-08-2002
			US 2003091576 A1	15-05-2003
			US 2003232047 A1	18-12-2003
EP 0317278	A	24-05-1989	AU 2560588 A	18-05-1989
			DK 639988 A	18-05-1989
			EP 0317278 A2	24-05-1989
			FI 885303 A	18-05-1989
			JP 1221394 A	04-09-1989
			NO 885108 A	18-05-1989
			NZ 226964 A	27-08-1991
			US 5340727 A	23-08-1994

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:		WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)	
see form PCT/ISA220			
		Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/US2004/D19057	International filing date (day/month/year) 14.06.2004	Priority date (day/month/year) 11.06.2003	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07K14/755, A61K38/00, C12N15/12, C12N15/82			
Applicant WYETH			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 86.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80286 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 apmu d Fax: +49 89 2369 - 4465	Authorized Officer Marinoni, J-C Telephone No. +49 89 2369-8563
---	---



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **PCT/US2004/019057**

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/019057

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☐ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/019057

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 43,46-52,55-67 partially

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 43,46-52,55-67 partially
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/019057

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/a.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-71
	No: Claims	none
Inventive step (IS)	Yes: Claims	11,16,20
	No: Claims	1-10,12-15,17-71
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-42,44,45,53,54,68-71
	No: Claims	none

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item II

Priority

The claimed priority is considered to be valid for the entire claimed subject-matter.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The method of claims 43, 46-52, 55-67 encompass methods of treatment of the animal body by therapy. No examination is required for said subject-matter according to Art. 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(v) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. The present application relates to fusion proteins comprising a modified GPIIb protein with a valine at position 233 and/or at position 239 and additionally one or several of the modifications Y276F, Y278F, Y279F, C85S or K237V on the one hand and a Fc region of a wild type immunoglobulin heavy chain on the other hand.
2. Reference is made to the following documents:
D1: WO 02/063003, 15 August 2002
D2: DONG J-F ET AL: "Novel gain-of-function mutations of platelet glycoprotein Ib α by valine mutagenesis in the Cys209-Cys248 disulfide loop: Functional analysis under static and dynamic conditions" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 275, no. 36, 8 September 2000, pages 27663-27670
D3: MARCHESE PATRIZIA ET AL: "Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib α with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 16, 1995, pages 9571-9578
D4: EP-A-0 317 278, 24 May 1989
D5: KENNY D ET AL: "NATURALLY OCCURRING MUTATIONS IN GLYCOPROTEIN IB α THAT RESULT IN DEFECTIVE LIGAND BINDING AND SYNTHESIS OF A TRUNCATED PROTEIN" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol.

92, no. 1, 1 July 1998, pages 175-183

3. None of the available documents disclose the instant subject-matter of any of claims 1-71, which is therefore considered to be novel.

The subject-matter of claims 1-71 meets the requirements of Art. 33(2) PCT concerning novelty.

4. Claims 1-6, 10, 12 and 68-71 are directed to proteins which are merely defined by a result to be achieved. The claims lack clarity (contrary to Art. 6 PCT). Furthermore the mere recitation of a result to be achieved without a clear technical feature necessary to obtain said result cannot be considered as involving an inventive step, contrary to Art. 56 EPC.

Claims 1-6, 10, 12 and 68-71 therefore do not meet the requirements of Art. 56 EPC concerning inventive step.

5. Claim 7 defines that the protein of claim 6 (a GPIb-alpha protein having lowered affinity for alpha-thrombin compared to the GPIb-alpha protein of SEQ ID No. 1 or 2) comprises at least one of the substitutions (not "substations" as incorrectly stated in claims 7 and 8) Y276F, Y278F and Y279F.

The closest prior art is considered to be D1.

D1 discloses fusion proteins consisting of GPIb-alpha protein having substitution 233V and/or 239V (i.e. the proteins of SEQ ID No. 1 and 2 respectively in the present application) on the one hand and a Fc region of a wild type immunoglobulin heavy chain on the other hand, multimeric complexes comprising the same, pharmaceutical compositions comprising the same, and their use in methods of inhibiting adherence of blood cells to a biological tissue and in methods of treating a disorder associated with platelet activation. Furthermore, D1 claims such fusion proteins that are more resistant to proteolysis than a wild type GPIb-alpha (claim 6) and refers to the prior art to state that tryptic cleavage sites in the GPIb-alpha protein are well-known (p.9, lines 18-22). Optionally, D1 foresees the use of a signal sequence (see p 11, lines 25-27). In view of D1, the technical problem underlying the present application resides in the provision of improved GPIb-alpha-Fc fusion proteins.

D2 discloses several mutants of GPIb-alpha, including the K237V mutant, and their benefit resulting in spontaneous (i.e. increased) vWF binding. Position K237 was

additionally known in the art to be a site of tryptic cleavage resulting in a GPIb-alpha consisting of two-chains held together by a disulfide bond. Said two-chain GPIb-alpha inhibits completely the ristocetin-mediated binding of vWF to platelets (see D4, p. 5, line 57-page 6, line 8), meaning that said cleavage is detrimental to the optimal activity of a recombinant GPIb-alpha.

The skilled person wanting to produce improved versions of recombinant GPIb-alpha or GPIb-alpha-Fc fusion proteins as in D1 would consider modifying GPIb-alpha at position 237 to avoid cleavage by introducing the K237V substitution of D2 that results in improved properties.

D3 discloses recombinant forms of GPIb-alpha having substitutions Y276F, Y278 F and/or Y279F. Said proteins have improved properties compared to wild type GPIb-alpha in that they display markedly reduced or absent binding to alpha-thrombin but have similar binding properties to vWF as wild type GPIb-alpha, both properties being advantageous in therapy.

The skilled person wanting to produce improved versions of recombinant GPIb-alpha or GPIb-alpha-Fc fusion proteins as in D1 would consider modifying GPIb-alpha at position 276, 278 and/or 279 to obtain GPIb-alpha with markedly reduced or absent binding of alpha-thrombin by introducing the Y276F, Y278F and/or Y279F substitutions of D3 that results in improved properties.

The subject-matter of claims 7-9, 13-15, 17-19, 21-67 therefore does not meet the requirements of Art. 33(3) PCT concerning inventive step.

6. None of the available documents discloses GPIb-alpha mutants having the mutation C65S. D5 merely discloses a natural mutant of the protein having a C65R substitution that is causative of Bernard-Soulier syndrom but fails to disclose the incidence of this substitution on the aggregation of the protein.

Therefore, it is considered that the subject-matter of claims 11, 16 and 20 meets the requirements of Art. 33(3) PCT concerning inventive step.

7. It is further noted that the expression "or a conservative variant thereof" does not restrict the claimed subject matter as to allow a clear definition of the subject-matter for which protection is sought, contrary to Art. 6 PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris,
Glovsky and Popeo, P.C.One Financial Center
Boston, MA 02111
United States of America

☒ Data Entry	Done By
☐ Docket Entry	
☐ Docket Cross Off	
☐ Previously Entered	
☐ No Docketing Req	
☐ EUTE	
☐ Annulment	

Date of mailing (day/month/year)
08 November 2005 (08.11.2005)Applicant's or agent's file reference
22058-583-061International application No.
PCT/US2004/019057International filing date (day/month/year)
14 June 2004 (14.06.2004)

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

WYETH
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

WYETH
A Corporation of the State of
Delaware
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.87.40

Authorized officer

NOV 1 8 2005
Christine Carrié
PCT/US2004/019057

Telephone No. (41-22) 338.95.75

**POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN VARIANTE ALFA IB DE GLICOPROTEÍNA DE
PLAQUETA Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS**

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los efectos deletéreos de desórdenes vasculares asociados tales como apoplejía, ataque de corazón, y arteriosclerosis se cree se originan, al menos en parte, por la acción inapropiada de una inflamación vascular y respuesta reparadora. La inflamación vascular y la respuesta reparadora involucran interacciones adhesivas entre varios tipos de células normalmente encontradas circulando libremente en la sangre. Ejemplos de tales interacciones incluyen aquellas que pueden ocurrir entre plaquetas, leucocitos y la pared interior de los vasos sanguíneos (es decir, el endotelio vascular). Bajo condiciones de esfuerzo cortante de alto fluido, las plaquetas se adhieren al endotelio por vía de una interacción entre el complejo ib-IX-V(GP) de glicoproteína sobre su superficie y el factor Willerbrand (vWF) presente en el subendotelio del vaso expuesto. Adicionalmente, las plaquetas que se adhieren al endotelio vascular se pueden unir y capturar plaquetas que circulan libremente por vía de sujeción mediada por vWF, permitiendo el crecimiento de los trombos a través de capas sucesivas de plaquetas. La cadena GPIbα del complejo GPIb-IX-V también puede facilitar la unión

de la α -trombina a la superficie de la plaqueta, mejorando el clivaje mediado por trombina del GPV y los receptores activados por proteasa (PAR).

En contraste, los leucocitos se pueden adherir al endotelio activado ya sea directamente, o indirectamente mediante una primera adhesión a las plaquetas vWF- inmovilizadas. En ambas instancias, las moléculas de superficie de célula de leucocito que se unen a las clases de integrina o selectina de receptores de adhesión median estos eventos de adhesión. Se cree que la adhesión de leucocito-plaqueta ocurre en parte, por vía de interacción del componente GPIb y la molécula integrina de superficie de leucocito Mac I del complejo GPIb-IX-V de superficie de plaqueta.

En respuesta a los disturbios vasculares tales como ruptura de la placa arterioesclerótica o lesión mecánica, por ejemplo, tal como la originada por angioplastia, colocación de stents, procedimientos de bypass cardiopulmonar, daño isquémico o estenosis, los leucocitos y plaquetas se pueden acumular en un sitio de lesión vascular y suministrar múltiples sustratos adhesivos el uno al otro. Esta acumulación de leucocitos y plaquetas conducen a la producción local de factores que incluyen, por ejemplo, mitógenos, citoquinas y quimoquinas, que originan la progresión deseada adicional de una enfermedad vascular.

Los polipéptidos terapéuticos que incluyen una región de unión vWF derivada de GPIb α se han descrito. Uno de tales polipéptidos se basa en una secuencia que contiene dos sustituciones de aminoácidos (G233V M239V) en la secuencia de aminoácido GPIb α humano tipo silvestre. Una proteína de fusión Ig que contiene 290 aminoácidos del dominio de unión vWF extracelular de su variante (nombrada GPIb2V-Ig) de su variante inhibe la trombosis arterial coronaria.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención suministra polipéptidos variantes Ib α de glicoproteína mejorados que son útiles como agentes terapéuticos para tratar desórdenes vasculares. En varias modalidades, las variantes muestran agregación reducida, estabilidad mejorada, unión reducida a trombina, o dos o más de estas propiedades. Un uso para los polipéptidos variantes de proteína Ib- α de glicoproteína es como una proteína de fusión para tratar condiciones vasculares asociadas con inflamación vascular, trombosis, arterioesclerosis y atonosis relacionada con angioplastia.

En un aspecto, las uniones de polipéptido con afinidad reducida a α trombina relacionadas con la unión a α trombina de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácido de

ocurrencia natural de GPIb α (ID de Sec. No.:1) humana o un polipéptido, denominado GPIb2V (ID de Sec. No.: 2), que incluye las sustituciones de aminoácido G233V Y M239V relacionadas con la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.: 1. Cuando el polipéptido se une con baja afinidad a la trombina, se hace más disponible para la formación de trombos, y el sangrado indeseable en un sujeto se minimiza. Ejemplos de polipéptidos que muestran unión de trombina reducida son polipéptidos que incluyen 1, 2, o 3 de las sustituciones de aminoácidos Y276F, Y278F, Y279V, o una variante conservadora de estos, relacionada con la secuencia de aminoácido relacionado con la ID de Sec. No. 1 o ID de Sec. No.:2.

En algunas modalidades, la agregación del polipéptido se reduce en relación con la agregación de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.1 o ID de Sec. No.:2 humana. En algunas modalidades, se observa agregación reducida durante la síntesis del polipéptido en una célula. Un ejemplo de un polipéptido que muestra agregación reducida es un polipéptido que incluye la sustitución de aminoácido C65s, o una variante conservadora de esta, relacionada con la secuencia de aminoácido relacionado con la ID de Sec. No.:1 o ID de Sec. No.:2.

En algunas modalidades, el polipéptido es más resistente a la proteólisis que un polipéptido que incluye la secuencia de

aminoácido de la ID de Sec. No.:1 o la ID de Sec. No.:2. Un ejemplo de tal polipéptido es un polipéptido que incluye la sustitución de aminoácido K237V, o una variante conservadora de esta, relacionada con la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.

Ejemplos de polipéptidos adecuados son aquellos que tienen las siguientes sustituciones secuencias de aminoácidos relacionadas con la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.1 o de la ID de Sec. No.:2: Y276F, Y276F K237V, Y276F C65S, Y276F Y278F Y279F, Y276F Y278F Y279F K237V y Y276F Y278F Y279F K237V C65S.

Los polipéptidos de la invención se pueden suministrar como proteínas de fusión. Por ejemplo, la proteína de fusión Iba glicoproteína puede incluir un primer polipéptido, que comprende al menos una región de variante de polipéptido Iba glicoproteína, ligada a un segundo polipéptido. En algunas modalidades, el segundo polipéptido forma un multímero, por ejemplo, un dímero. En algunas modalidades, el segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina.

También se suministra mediante la invención un ácido nucleico que codifica el polipéptido variante Iba glicoproteína así como también vectores, células y métodos para expresar el

polipéptido variante Iba glicoproteína que utiliza ácidos nucleicos que codifican el polipéptido variante Iba glicoproteína. La invención incluye adicionalmente un polipéptido de fusión variante Iba glicoproteína que codifica ácido nucleico, así como también un vector que contiene ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fusión Iba glicoproteína descritos aquí y una célula que contiene los vectores o ácidos nucleicos descritos aquí.

También se suministra mediante la invención un método para inhibir la adhesión de leucocitos a un tejido biológico al poner en contacto un leucocito con un polipéptido de fusión Iba glicoproteína. El leucocito es puesto en contacto en una cantidad suficiente para inhibir la adherencia del leucocito y del tejido biológico.

En otro aspecto, la invención suministra un método para tratar un desorden asociado con la activación de plaquetas. El método incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido de fusión Iba glicoproteína.

También se incluyen en la invención composiciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos variantes Iba glicoproteína, o polipéptidos de fusión variante Iba glicoproteína.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos científicos y técnicos aquí tienen el mismo significado como se entenderá comúnmente por una persona experta en la materia a la cual esta invención pertenece. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen adelante. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente descripción, incluye definiciones, que las controlarán. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos se ilustran solo y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una gráfica que muestra la inhibición de quimeras GPIba en agregación de plaquetas humanas inducidas por ristocetina. Se muestra la transmitancia de luz (eje-y) para las quimeras GPIba tipo silvestre ("Normal"), y GPIb-Ig WT, GPIba-290/2V-Ig, GPIba-290/2V/FFF-Ig.

La Figura 2 es una gráfica que muestra la eficacia antitrombótica de las quimeras GPIb α en un modelo Folt. Canino de trombosis coronaria (eje y: sangre LCX).

La Figura 3 es una gráfica que muestra la inhibición de la función de plaqueta mediante GPIb/290/2V-Ig y GPIb/290/2V/FFF-Ig en un modelo canino para trombosis coronaria evaluado por PFA-100.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los polipéptidos derivados de Iba glicoproteína con unión reducida a la alfa trombina, agregación reducida y/o resistencia incrementada a la proteólisis de acuerdo con la invención son útiles como agentes terapéuticos en, por ejemplo, tratamiento de varias condiciones que benefician al inhibir la unión de células de plaquetas activadas a vWF en células vasculares. En algunas modalidades, los polipéptidos se suministran como proteínas de fusión-

Las variantes de proteína de la invención con trombina reducida que se unen ventajosamente resultan en reducción de sangrado. La unión de la trombina al receptor GPIb α de plaqueta es necesario para coagulación. La unión de la trombina a un GPIb soluble terapéutico puede aumentar el

sangrado in vivo al secuestrar la trombina lejos del receptor GPIIb de plaqueta, reduciendo así la agregación de plaquetas inducida por trombina. Así, las variantes de trombina que muestran afinidad reducida para hacer que la trombina esté disponible para interactuar con el receptor GPIIb de plaqueta, que en cambio promueve la coagulación.

Un polipéptido adecuado incluye una secuencia de aminoácido con 1 a 15 sustituciones de aminoácidos, eliminaciones o inserciones relacionadas con aminoácidos en la región entre, e incluye aminoácidos 65-2-79 de una secuencia de proteína GPIIb humana de ocurrencia natural mostrada en la ID de Sec. No.:1, adelante, o de la variante GPIIb2V, cuya secuencia de aminoácido se muestra en la ID de Sec. No.:2, adelante. En una o más modalidades, el polipéptido tiene uno o más de las siguientes actividades: (i) unión de afinidad reducida a la α trombina relacionada con la unión de una α trombina a un polipéptido que incluye una secuencia de un aminoácido de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2 humana; (ii) agregación reducida relacionada con la agregación de un polipéptido que incluye la secuencia de un aminoácido de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2; o (iii) resistencia incrementada a la proteólisis relacionada con un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.

Mientras no se desea estar ligado por la teoría, se cree que estas propiedades se basan en los resultados de sustituciones en regiones objetivo en la secuencia de polipéptido de la variante GPIb2V (ID de Sec. No.:2). El cambio de residuo de cisteína a serina en la posición 65 (es decir, C65S) conduce a la inhibición de la segregación de la molécula GPIb α , en particular durante un proceso de producción recombinante. Los residuos de tirosina encontrados en las posiciones 276, 278, y 279 en la secuencia de tipo silvestre son modificados translacionalmente en forma normal a sulfotirosina, la cual crea una interacción electrostática aniónica con la α trombina. La eliminación selectiva de estos residuos de tirosina al convertirlos a fenilalanina (es decir sustituciones Y276F, Y278F, Y279F) reduce la unión a la α trombina (Marchese et al., J.Biol.Chem. 270:9571-78), mientras que retiene la unión deseada a la vWF. Una sustitución de lisina por valina en la posición 237 evitará la proteólisis durante el proceso de producción recombinante. Un fragmento de secuencia de aminoácido 290 de una cadena GPIb α de glicoproteína humana de ocurrencia natural se establece adelante:

HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATLMPYTRLTQNLDRCEL
TKLQVDGTLFVLGTL DLSHNQLQSLPLLGQTLPALTVLDVSTNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKN
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTEL PAGLLNGLENLDTLLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
LHGNPWCNCEILYFRNLQDNAENVYVWKQGV DVKAMTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCP TLG
DEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVR ID de (Sec. No: 1)

2

La secuencia de aminoácido de la variante GPIb2V se suministra adelante como la ID de Sec. No.:2. Esta variante también se discute en la solicitud de patente U.S. número de publicación 20030091576, y su contraparte WO 02/063003.

HPICEVSKVASHLEVNCCKRNLTALPPDLPKDITLHLSNLLYTFSLATLMPYTRLTQNLDRCEL
TKLQVDGTLFVLGTLDLSHNQLQSLPILGQTLPALTVLDVSEFNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKN
ELKTLPPGLLTFTPKLEKLSLANNNLTLPAGLLNGLENLDTLLQLQENSLYTIIPKGFTGSHLLPFAF
LHGNFWLCNCEILYFARWLQDNAENVYVWKQVVDVKAVTSNVASVQCDNSDKFPVYKYPGRGCPTLG
DEGDTDLYDYYPEEDTEGDKVR ID de (Sec. No: 2)

En algunas modalidades, el polipéptido no tiene más de 12 sustituciones, inserciones, o eliminaciones relacionadas con la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:1 o la ID de Sec. No.:2. Por ejemplo, esta puede tener 10, 8, 7, 6, 5, o menos sustituciones, inserciones, o eliminaciones relacionadas con la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.1 o de la ID de Sec. No.:2. En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones están en la región entre los aminoácidos 65 y 279, inclusive.

En algunas modalidades, las uniones de polipéptido con afinidad reducida a la alfa trombina relacionadas con la unión a la alfa trombina de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácido ID de Sec. No.:1 o de ID de Sec. No.:2. Ejemplos de polipéptido que muestran unión reducida son polipéptidos que incluyen uno, dos, o tres de las sustituciones de aminoácido Y276F, Y278F, Y279V, o una

variante conservadora de estos, relacionadas con las secuencias de aminoácidos de la ID de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2.

En algunas modalidades la agregación de los polipéptidos es relativamente reducida a la agregación de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácido de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2. En algunas modalidades, la agregación reducida se observa durante la síntesis de un polipéptido en una célula. Un ejemplo de un polipéptido que muestra agregación reducida es un polipéptido que incluye la sustitución de aminoácido C65S, o una variante conservadora de esta, relacionada con la secuencia de aminoácido de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2.

En algunas modalidades, el polipéptido es más resistente a la proteólisis que un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2. Un ejemplo de tal un polipéptido es un polipéptido que incluye un aminoácido de sustitución K237V, o una variante conservadora de este, relacionado con la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2.

En algunas modalidades, el polipéptido incluye una secuencia de aminoácido con uno a 10 sustituciones de aminoácido, inserciones, o eliminaciones relacionadas con los aminoácidos

25

1-290 de la ID de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2, dado que al menos una de las sustituciones de aminoácido es C65S, K237V, Y276F Y278F, Y279F, K237V.

Ejemplos de polipéptidos adecuados son aquellos que tienen las siguientes sustituciones de aminoácidos relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.: 1 o de la ID de Sec. No.:2: Y276F, Y276F K237V, Y276F C65S, Y276F Y278F Y279F, Y276F Y278F Y279F K237V y Y276F Y278F Y279F K237V C65S.

La invención también incluye polipéptidos con uno o más, por ejemplo, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 15 o más sustituciones de aminoácido en polipéptidos derivados de secuencias de IB α glicoproteína en adición a aquellas correspondientes a la ID de Sec. No.: 1 y ID de Sec. No.:2. Estos incluyen, por ejemplo, GPIb 302 (ID de Sec. No.: 3), GPIb302/2A (ID de Sec. No.:4) GPIb/4X (ID de Sec. No.:5), y GBib290/1A (ID de Sec. No.: 6).

HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATIMPYTRLTQNLDRCEL
TKLQVDGTL PVLGTL DLSHNQLQSLPLLGQTL PALT VLDVSNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGN
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNLTTEL PAGLLNGLENLDTLLQLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
LHGNPWL CNCEILYFRWLQDNAENVYVWKQGV DVKAMTSN VASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLG
DEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVRATRTVVKFPTKA

ID de (Sec. No: 3)

HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATIMPYTRLTQNLDRCEL
TKLQVDGTL PVLGTL DLSHNQLQSLPLLGQTL PALT VLDVSNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGN
ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNLTTEL PAGLLNGLENLDTLLQLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
LHGNPWL CNCEILYFRWLQDNAENVYVWKQGV DVKAMTSN VASVQCDNSDKFPVYKYPGKGCPTLG
DEGDTDL YDYYPEEDTEGDKVAATATVVKFPTKA

ID de (Sec. No: 4)

25 7

HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATLMPYTRLTQNLDRCEL
 TKLQVDGTLFVLGTLDSLHNQLQSLPLLGGTLFALTVDVSFNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGN
 ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPAGLLNGLENLDTLLLLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
 LHGNPWLNCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQVVDVKAVTSNVA SVQCDNSDKFPVKYPGKGCPTLGD
 EGD TDLYDYYPEEDTEGDKVAATATVVKFPTKA ID de (Sec. No: 5)

HPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLATLMPYTRLTQNLDRCEL
 TKLQVDGTLFVLGTLDSLHNQLQSLPLLGGTLFALTVDVSFNRLTSLPLGALRGLGELQELYLKGN
 ELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPAGLLNGLENLDTLLLLQENSLYTI PKGFFGSHLLPFAF
 LHGNPWLNCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV DVAAMTSNVA SVQCDNSDKFPVKYPGKGCPTLG
 DEGDT DLYDYYPEEDTEGDKVR ID de (Sec. No: 6)

QATEYEYLDYDFLPETEPPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKD TTILHLS ENLLYTFSLAT
 LMPYTRLTQNLDRCELTKLQVDGTLFVLGTLDSLHNQLQSLPLLGGTLFALTVDVSFNRLTSLPL
 GALRGLGELQELYLKGNELKTLPPGLLTPTPKLEKLSLANNNLTELPAGLLNGLENLDTLLLLQENSL
 YTI PKGFFGSHLLPFAFLHGNPWLNCNCEILYFRRWLQDNAENVYVWKOVVDVKAVTSNVA SVQCDNS
 DKFPVKYPGKGCPTLGDEGDT DLYDYYPEEDTEGDKVR ID de (Sec. No: 7)

Una variante de proteína glicoproteína se puede suministrar como parte de una proteína de fusión. Por ejemplo, las proteínas de fusión proteína-inmunoglobulina Iba glicoproteína son útiles para inhibir la adherencia de plaquetas y leucocitos a tejidos biológicos, tales como por ejemplo el endotelio vascular. Las proteínas de fusión de la invención, o ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de fusión, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas y administrar a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando Iba glicoproteína (tal como Factor Willebrand, Mac-1), P-selectina o trombina) y una proteína Iba glicoproteína en la superficie de una célula,

tal como una plaqueta. La inhibición de la unión suprime la agregación de la plaqueta mediada por proteína Iba glicoproteína y asociada con la señal de transducción in vivo.

Las proteínas de fusión de inmunoglobulina-proteína Iba glicoproteína se pueden utilizar para modular la biodisponibilidad del ligando con un cognato proteína Iba glicoproteína. La inhibición de la interacción de proteína Iba glicoproteína ligando proteína Iba glicoproteína es útil terapéuticamente para, entre otros, el tratamiento de inflamación vascular y otros desórdenes vasculares asociados con la activación de plaquetas.

Polipéptidos de Fusión Iba variante Glicoproteína

En varios aspectos la invención suministra proteínas de fusión que incluyen un primer polipéptido que contienen al menos una porción de una variante polipéptido Iba glicoproteína ligado operativamente a un segundo polipéptido. Como se utiliza aquí, una "proteína de fusión" Iba glicoproteína o "proteína quimérica" incluye al menos una porción de una variante de polipéptido Iba glicoproteína ligada operativamente a un polipéptido Iba sin glicoproteína. "Un polipéptido Iba glicoproteína" o "variante de polipéptido Iba glicoproteína" se refiere a un polipéptido que tiene una

secuencia de aminoácido que corresponde al menos a una porción de un polipéptido Iba glicoproteína, mientras que, un "polipéptido Iba sin glicoproteína" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la proteína Iba glicoproteína, por ejemplo una proteína que es diferente del polipéptido Iba glicoproteína o fragmento y que se deriva de la misma o de un organismo diferente. Dentro de una proteína de fusión Iba glicoproteína el polipéptido Iba glicoproteína puede corresponder a todos o a una porción de proteína Iba.

En una modalidad, una proteína de fusión Iba glicoproteína comprende al menos una porción biológicamente activa de una proteína Iba glicoproteína. En otra modalidad, una proteína de fusión Iba glicoproteína comprende al menos dos porciones biológicamente activas de una proteína Iba glicoproteína. En aún otra modalidad, una proteína de fusión Iba glicoproteína comprende al menos tres porciones biológicamente activas de una proteína Iba glicoproteína. Dentro de la proteína de fusión, el término "ligado operativamente" se pretende que indique que el primer y segundo polipéptido se ligen en una forma que permita al menos una fusión asociada con un polipéptido Iba glicoproteína. Cuando se utiliza para



referirse a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión Iba glicoproteína, el término ligado operativamente significa que un ácido nucleico que codifica el polipéptido Iba glicoproteína y el polipéptido Iba sin glicoproteína se fusionan en estructura el uno al otro. El polipéptido Iba sin glicoproteína se puede fusionar al N-terminal o C-terminal del polipéptido Iba glicoproteína.

En una modalidad adicional, la proteína de fusión Iba glicoproteína se puede ligar a uno o más porciones adicionales. Por ejemplo, la proteína de fusión Iba glicoproteína puede estar adicionalmente ligada a una proteína de fusión GCT en la que la secuencia de proteína de fusión Iba glicoproteína se fusionan al C-terminal de las secuencias GST (es decir, S-transferasa glutatona). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la proteína de fusión Iba glicoproteína.

En otra modalidad, la proteína de fusión incluye una secuencia de señal heteróloga, (es decir una secuencia de polipéptido que no está presente en un polipéptido codificado por un ácido nucleico Iba glicoproteína) en su N-terminal. Por ejemplo, la secuencia de señal Iba glicoproteína nativa puede ser removida y remplazada con una secuencia de señal de otra proteína. En ciertas células huésped (por ejemplo,

células huésped de mamífero), la expresión y/o secreción de Iba glicoproteína se puede incrementar a través del uso de una secuencia de señal heteróloga. Una secuencia de señal representativa es MPLLLLLLLLLPSPLHP (ID de Sec. No.:8). Otra secuencia de señal representativa es MPLQLLLLLLILGPGNSLQL WDTWADEAEKALGPLLARDRR. (ID de Sec. No.:9). Si se desea, uno o más aminoácidos pueden ser insertados adicionalmente entre la primera porción de polipéptido que comprende la porción GP Iba y la segunda porción de polipéptido.

Una proteína de fusión o quimérica de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos GPIba, así como también las secuencias de aminoácidos de estos polipéptidos, de los cuales la variante de polipéptido GPIba variante se construyen se describen en la WO02/063003, los contenidos de los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Por ejemplo, los fragmentos de ADN para las secuencias variantes de polipéptido se ligan juntos en estructura de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, al emplear términos de extremo despuntado o extremo cohesivo para ligación, restricción de digestión de enzima para suministrar el término apropiado, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar

unión indeseada, y ligación enzimática. En otra modalidad, el gen de función puede ser sintetizado mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación de los PCR mediante fragmentos de gen se pueden llevar a cabo al utilizar iniciadores de anclaje que elevan a sobresalientes complementarias entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden posteriormente ser recocidas y reamplificadas para generar una secuencia de gen quimérico (ver, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Más aún, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente que codifican una porción de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Un ácido nucleico que codifica Iba glicoproteína puede ser clonada en un vector de expresión de tal forma que la porción de fusión se liga en estructura a la proteína de inmunoglobulina.

Los polipéptidos de fusión Iba glicoproteína pueden existir tales como oligómeros, como dímeros o trímeros. En algunas modalidades, el polipéptidos de fusión Iba glicoproteína es un dímero.

En algunas modalidades, la porción de polipéptido Iba se suministra como un polipéptido GPIba variante que tiene una

mutación en la secuencia GPIIb/IIIa de ocurrencia natural (tipo silvestre) que resulta en mayor afinidad (relacionada con la secuencia no mutada) de unión del polipéptidos GPIIb/IIIa a una molécula de superficie celular de leucocito. Por ejemplo, el polipéptido mutante se puede unir con mayor afinidad a un factor Willebrand (vWF). Esta reactividad incrementada, o hiperresponsivo puede ser evaluada utilizando bajas concentraciones de ristocetina. Alternativamente, cualquier otro medio adecuado para determinar la reactividad del polipéptido con vWF también se puede utilizar para identificar polipéptidos que son "más" reactivos con vWF, es decir, más reactivos que el GPIIb/IIIa tipo silvestre de ocurrencia natural. Ejemplos de variantes de polipéptido GPIIb/IIIa que se unen con mayor afinidad a variantes GPIIb/IIIa que incluyen vWF que incluyen alteraciones de secuencia en la región de articulación de un polipéptido GPIIb/IIIa. La región de articulación se define como la región que incluye los residuos 220 a 310 y se reporta por ser el sitio de mayor unión para vWF con el polipéptido GPIIb/IIIa. Las mutaciones en la región de articulación incluye aquellas en el residuo 233, que en el GPIIb/IIIa tipo silvestre codifica glicina. Un ejemplo de sustitución adecuada es una en la que la glicina en la posición 233 se reemplaza con valina (es decir G233V). Un segundo sitio para la mutación en la región de articulación está en el residuo 239, la cual en GPIIb/IIIa de tipo silvestre

codifica metionina. Una sustitución de valina por metionina 239 es una sustitución representativa, pero otros aminoácidos también pueden ser sustituidos. Adicionalmente, las variantes de región de articulación de polipéptidos GPIb α adecuados para uso en un polipéptido de fusión de la presente invención tienen mutaciones en posiciones de residuo 233 y 239. (ver por ejemplo, Dong et al., JBC 275:36 27663-27670 (2000)) Así, la invención incluye proteínas de fusión que tienen una sustitución en la posición 239, es decir, una sustitución M239V de un polipéptido GPIb α variante. También dentro de la invención hay una proteína de fusión que tiene una sustitución en la posición 233, por ejemplo, G233V, y una proteína de fusión que incluye un polipéptido GPIb α variante composiciones en 233 y 239, por ejemplo una sustitución G233V y M239V.

En algunas modalidades, el primer polipéptido incluye un polipéptido GPIb α de longitud completa. Alternativamente, el primer polipéptido comprende menos del polipéptido GPIb α de longitud completa. Por ejemplo, el primer polipéptido es de menos de 600 aminoácidos de longitud, por ejemplo, menos o igual que 500, 250, 150, 100, 50, o 25 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, el segundo polipéptido es soluble. En algunas modalidades, el segundo polipéptido mejora la vida

media, por ejemplo, la vida media del suelo (del polipéptido ligado). En algunas modalidades, el segundo polipéptido incluye una secuencia que facilita la asociación del polipéptido de fusión con un segundo polipéptido GPIb α . En algunas modalidades, el segundo polipéptido incluye al menos una región de polipéptido inmunoglobulina. El polipéptido de fusión inmunoglobulina se conoce en la técnica y se describe en por ejemplo, las patentes U.S. No. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; y 5, 455,165.

En algunas modalidades, el segundo polipéptido comprende un polipéptido inmunoglobulina de longitud completa. Alternativamente, el segundo polipéptido comprende menos del polipéptido inmunoglobulina de longitud completa, por ejemplo, una cadena pesada, cadena liviana, Fab, Fab2, Fv, o Fc. Por ejemplo, en algunas modalidades el segundo polipéptido incluye la cadena pesada de un polipéptido inmunoglobulina. En modalidades adicionales, el segundo polipéptido incluye la región Fc de un polipéptido inmunoglobulina.

En otro aspecto de la invención, el segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo silvestre. La función efectora incluye por ejemplo, el receptor de unión Fc, la fijación complementaria y actividad de eliminación de célula T (ver, por ejemplo, patente U.S. No. 6,136,310). Los

métodos para ensayar la actividad de eliminación de la célula T, función efectora Fc y estabilidad de anticuerpo se conocen en la técnica. En una modalidad el segundo polipéptido tiene bajo o no tiene afinidad para el receptor Fc. En una modalidad alternativa, el segundo polipéptido tiene baja o no tiene afinidad para el complemento de proteína Clq.

Una segunda secuencia representativa de polipéptido incluye la secuencia de aminoácido de ID de Sec. No.:10. Esta secuencia incluye una región Fc. Los aminoácidos subrayados son aquellos que difieren del aminoácido encontrado en la posición correspondiente de la secuencia de inmunoglobulina tipo silvestre.

HTCPFCFAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLNI¹SRTP²EVTCVVVDVSHEDPEVK³FNWYVDGVEVHNAKTKPREDQ
YNSTYRVVSVLT⁴LVLHQD⁵WLNGKEYKCKVSNKALPVP⁶IENTISKANGQPREPQVYTLPPSR⁷EDNTN⁸QVSLTC
LVKGFYP⁹SDIAVENESNGQPE¹⁰NNYK¹¹ITPPVLDSDG¹²SFFLYSKLTVDKSRNQQGNV¹³FC¹⁴SVNHEALH¹⁵NHYTQK
SLSLSPGK (ID de Sec. No.: 10)

Las variantes de polipéptido GPIba pueden incluir, en adición a la sustitución de aminoácido sustituido designado, un aminoácido alternativo que cumple la misma función como el ácido designado. En algunas modalidades, el aminoácido alternativo se relaciona con el aminoácido designado como una sustitución de aminoácido conservador del aminoácido indicado. Una "sustitución del aminoácido conservador" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias

de residuos de aminoácidos que tienen similares cadenas laterales se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales no polares cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisterna), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanita, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Así, en algunas modalidades, en cambio de remplazar una tirosina con una fenilalanina en la posición 276, 278, o 279 (Y276F, Y278F, o Y279F), el residuo de tirosina se puede remplazar con triptófano o histidina. De forma similar, para la variante C65S, la cisteína puede alternativamente ser remplazada con glicina, asparagina, glutamina, treonina, o tirosina. Para la sustitución L237V, la lisina también se puede alternativamente remplazar con alanita, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina o triptófano.

La invención también incluye un polipéptido cuya secuencia es 80%, 55%, 90%, 95%, 98%, o 99% homólogo a la secuencia descrita en la ID de Sec. No.:1 o ID de Sec. No.: 2, dado que

esta incluye una o más de las estaciones de aminoácido C65S, K237V, Y276F Y278F, Y279F, K237V. Derivados o análogos de ácidos nucleicos o proteínas de la invención incluyen, pero no están limitadas a, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o proteínas de la invención, en varias modalidades, mediante al menos cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o aún 99% de identidad (por ejemplo, una identidad de 80-99%) sobre una secuencia de aminoácido o ácido nucleico de tamaño idéntico o cuando se compara a una secuencia alineada en la cual la alineación se hace mediante un programa de homología de computador conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico de codificación es capaz de hibridizar al complemento de una secuencia de codificación de las proteínas mencionadas anteriormente bajo condiciones restrictivas, moderadamente restrictivas o bajas restrictivas. Un programa de ejemplo es el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) que utiliza las configuraciones por defecto, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman.

Otro aspecto de la invención pertenece a los vectores (que incluye vectores de expresión) que contienen un ácido nucleico que codifica polipéptidos de fusión Iba de glicoproteína, o derivados, fragmentos, análogos o homólogos de estos. Los vectores de expresión recombinante de la

invención pueden ser diseñados para expresión de polipéptidos de fusión Iba de glicoproteína en células procarióticas o eucarióticas.

En otra modalidad, el vector de expresión del polipéptido de fusión Iba glicoproteína es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para expresión en levadura *Saccharomyces cerevisiae* son conocidos en la técnica.

Alternativamente, el polipéptido de fusión Iba glicoproteína puede ser expresado en células de insectos que utilizan métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, con vectores de expresión de baculovirus.

En aún otra modalidad, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamíferos que utilizan vectores de expresión de mamífero.

En otra modalidad, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferencialmente en un tipo de célula particular (por ejemplo, elementos bioreguladores de tejido específico se utilizan para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores de tejido específico se conocen en la técnica.



La invención suministra además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN se liga en forma operativa a una secuencia reguladora en una forma que permite la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido a una mRNA de polipéptido de fusión de un Iba glicoproteína. Las secuencias reguladoras ligadas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido se puede escoger, de tal forma que dirige la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos de célula, por ejemplo promotores virales y/o mejoradores, o secuencias reguladoras que pueden ser escogidas porque dirigen la expresión específica de tipo de célula o tejido específico constitutivo de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, la actividad de la cual se puede determinar mediante el tipo de célula dentro de la que el vector se introduce.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procarióticas o eucariota. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión Iba glicoproteína pueden ser expresados en células bacterianas

tales como E. coli, células de insectos, células de almidón o mamífero (tales como humano, células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células de huésped adecuado se conocen por aquellos expertos en la técnica.

El vector de ADN puede ser introducido dentro de células procarióticas o eucarióticas por vía de transformación convencional o técnicas de transfección.

Las células de huésped de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS pueden ser transfectadas con vectores de expresión para permitir, por vía de la modificación post-translacional, la generación de epítomos Lewis^x sialilo en los glicanos N-ligados y O-ligados de polipéptidos de fusión Iba glicoproteína. En el caso de las células CHO estas requieren la coexpresión de una fucosiltransferasa α -1,3/1,4 (Kukowska-Latallo et al., Genes Dev. 4:1288-303, 1990) y enzimas beta-1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa núcleo 2. (Kumar et al., Blood 88:3872-79, 1996). La presencia de los epítomos Lewis^x sialilo en los glicanos N-ligados y O-ligados de polipéptidos de fusión Iba glicoproteína mejorarán la unión a las selectinas.

Para transfección estable de las células de mamífero, se conoce la técnica que, dependiendo del vector de expresión y

de la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de genes puede afectar el ADN extranjero dentro de su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) generalmente se introduce dentro de las células huésped junto con el gen de interés. Varios de los marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a las drogas, tal como el G418, igromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable se puede introducir dentro de una célula huésped en el mismo vector de tal forma que codifica los polipéptidos de fusión I β glicoproteína o puede ser introducido en un vector separado. Las células transfectadas en forma estable con el ácido nucleico introducido pueden ser identificadas mediante selección de droga (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariótica o eucariótica en un cultivo, puede ser utilizada para producir (es decir expresar) polipéptidos de fusión I β glicoproteína. De acuerdo con esto la invención suministra adicionalmente métodos para producir polipéptidos de fusión I β glicoproteína que utilizan las células huésped de la invención. En una modalidad, el método comprende

cultivar la célula huésped de la invención (dentro de la cual se ha introducido un vector de la expresión recombinante que codifica polipéptidos de fusión Iba glicoproteína) en un medio adecuado de tal forma que se producen los polipéptidos de fusión Iba glicoproteína. En otra modalidad, el método comprende adicionalmente aislar el polipéptidos de fusión Iba glicoproteína del medio o de la célula huésped.

Los polipéptidos de fusión pueden ser purificados de acuerdo con las condiciones convencionales tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electrofóresis o similares.

La síntesis química de los polipéptidos facilita la incorporación o modificación de aminoácidos no naturales, que incluyen aminoácidos D y otras moléculas pequeñas orgánicas. El reemplazo de uno o más aminoácidos L en un péptido con las correspondientes isoformas de aminoácido D pueden ser utilizadas para incrementar la resistencia de los péptidos a hidrólisis enzimática, y para mejorar uno o más propiedades de los péptidos biológicamente activos, es decir, unión de receptores, potencia funcional o duración de acción.

La introducción de enlaces cruzados covalentes dentro de una secuencia de péptido pueden constreñir conformacionalmente y topográficamente la estructura del polipéptido. Esta

estrategia se puede utilizar para desarrollar análogos de péptido de los polipéptidos de fusión con potencia incrementada, selectividad y estabilidad. En razón a que la entropía conformacional de un péptido cíclico es inferior que su contraparte lineal, la adopción de una conformación específica puede ocurrir con una reducción más pequeña en entropía para un análogo cíclico que para un análogo acíclico, haciendo por lo tanto la energía libre para una unión favorable. La macrociclización es a menudo acompañada mediante la formación de una unión de amida entre el péptido N-y C-terminal entre una cadena lateral y el N- o C-terminal [por ejemplo, $K_3Fe(CN)_6$ a un pH de 8.5], o entre dos cadenas de aminoácidos laterales. También se introducen puentes de disulfuro dentro de secuencias lineales para reducir su flexibilidad. Adicionalmente, el reemplazo de residuos de cisteína con penicilamina (Pen, 3-mercapto-(D) valina) se ha utilizado para incrementar la selectividad de algunas interacciones de receptor opioide.

Composiciones Farmacéuticas que incluyen polipéptidos de fusión Iba glicoproteína o ácidos nucleicos que codifican los mismos

Las proteínas de fusión Iba glicoproteína o moléculas de aminoácido que codifican estas proteínas de fusión (también referidas aquí como "terapéuticos" o "compuestos activos" de

la invención, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de estos, pueden ser incorporados dentro de las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones comprenden típicamente la molécula de ácido nucleico, proteína o anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" se pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacteriales y antifungales, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Portadores adecuados se describen en la edición más reciente del Remington Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora aquí como referencia. Ejemplos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no están limitados a, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y 5% de albúmina de suero humano. Liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos también se pueden utilizar. El uso de medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conocen bien en la técnica. Excepto para cualquier medio convencional o agente es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de este en las composiciones. Compuestos activos complementarios también se pueden incorporar dentro de las composiciones.

Los agentes activos descritos aquí también se pueden formular como liposomas. Los liposomas se preparan por métodos conocidos en la técnica. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la patente U.S. No. 5,013,556.

Los liposomas particularmente útiles pueden ser generados por el método de evaporación de fase reversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se escurren a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta propuesta de administración. Ejemplos de ruta de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (es decir, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa, y administración rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, glicoles de polietileno, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacteriales tales como alcohol de bencilo o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido

ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como etilenodiaminatetracético (EDTA); amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles (en donde el agua es soluble) o dispersiones de polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacterioestática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina amortiguada de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida para que exista el alcance fácil de jeringa. Esta debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y propilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuados de estos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo,

mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de benzoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede alcanzar mediante varios agentes antibacteriales y antifungosos, por ejemplo, para menos, clorbutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, los agentes isotónicos se pueden incluir en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol; y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión de la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoesterato de aluminio y gelatina.

Las soluciones estériles inyectables se pueden preparar al incorporar el compuesto activo (por ejemplo, una proteína de fusión Iba glicoproteína) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación del compuesto activo dentro de un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secados al vacío y

secado por congelamiento lo que produce un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril de esta.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Ellas se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimidas en tabletas. Para los propósitos de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se puede utilizar en la forma de tabletas, píldoras o cápsulas. Las composiciones orales también se preparan utilizando un portador fluido para uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y es triturado o tragado. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Las tabletas, pastillas, cápsulas, píldoras y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligador tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como esterato de magnesio o esterotes; un glidante tal como óxido de silicio coloidal; un agente endulzante tal como sucrosa o sacarina; un agente saborizante tal como hierbabuena, metilsalicilato, o saborizante de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se administran en la forma de un rociado de aerosol de un contenedor presurizado o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios de transmucosa o transdérmicos. Para administración tras mucosa o transdérmica, penetrantes apropiados para la barrera al ser perneada se utilizan en la formulación; tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la administración transmucosa, detergentes, sales de bilis, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa también se acompaña a través del uso de rociadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también se preparan en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una modalidad, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación

rápida del cuerpo, tales como formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulada. Polímeros biocompatibles, biodegradables se pueden utilizar, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensiones liposomales, (que incluyen liposomas objetivadas para detectar células con anticuerpos monoclonales para agentes virales) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden ser preparados de acuerdo con métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

En algunas modalidades, las composiciones orales o parenterales se formulan en forma de unidades de dosis para facilidad de administración y uniformidad de dosis. La forma unitaria de dosis como se utiliza aquí se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosis unitaria para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de un compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéuticamente requerido. La especificación para las formas de unidad de dosis de la invención se dictan por y

directamente dependiente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a ser alcanzado, y las limitaciones inherentes en la técnica de compuestos tales como compuestos activos para el tratamiento de individuos.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden insertar dentro de vectores y se utilizan como vectores de terapia de gen. Los vectores de terapia de gen se pueden administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local, o mediante administración estereotáctica. La preparación farmacéutica del vector de terapia de gen puede incluir el vector de terapia de gen en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el vehículo de administración de gen es embebido. Alternativamente, cuando el vector de administración de gen completo puede ser producido en intacto desde la célula recombinante, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir uno o más células que produce el sistema de administración de gen.

Las preparaciones de liberación sostenida se pueden preparar, si se desea. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, tales matrices están en la forma de artículos con forma, por

ejemplo películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli (2-hhidroxietyl-metacrilato) o poli (vinil alcohol)), poliáctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-vinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico degradable-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico). Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilacetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de cien días, ciertas proteínas liberan hidrogeles para periodos de tiempo más corto.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, paquete, o dispensador junto con instrucciones para administración.

MÉTODOS PARA INHIBIR LA ADHERENCIA EN UN SISTEMA BIOLÓGICO

Incluido en la invención hay un método para inhibir la adherencia de una célula sanguínea a un tejido biológico en un sistema biológico. El método incluye agregar a un sistema biológico un polipéptido de fusión de la invención en una cantidad suficiente para inhibir la adherencia de una célula

sanguínea al tejido biológico. La célula sanguínea puede ser por ejemplo, un leucocito, plaqueta o célula glóbulo rojo. El leucocito puede ser cualquier leucocito que es capaz de adherirse a un tejido biológico. En varios aspectos el leucocito es un granulocito, (es decir, neutrófilo, basófilo, y eosinófilo), monocito (es decir, macrófago) o linfocito (por ejemplo, T-linfocito, B-linfocito, linfocitos que infiltran tumor o células naturales asesinas). En algunas modalidades, los leucocitos expresan una integrina $\beta 2$, es decir Mac-1. Alternativamente, el leucocito expresa un ligando selectina.

También incluido en la invención existen métodos para inhibir la adherencia de una proteína a un tejido biológico en un sistema biológico. El método incluye agregar a un sistema biológico un polipéptido de fusión de la invención en una cantidad suficiente para inhibir la adherencia de la proteína al tejido biológico.

La proteína puede estar asociada a la membrana (por ejemplo, covalentemente, no covalentemente, o iónica). Alternativamente, la proteína puede estar en una forma soluble (es decir en solución). La proteína es un factor Willebrand, trombina, P-selectina de $Ib\alpha$ glicoproteína.

Como se utiliza aquí un sistema biológico significa incluir cualquier sistema que comprende componentes biológicos, por ejemplo, células, proteínas, carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos. El sistema biológico puede ser un sistema in vivo, ex vivo o in Vitro.

"Adherencia" significa que incluye cualquier interacción biológica de leucocito, por ejemplo, enrollado, adhesiones firmes o interacción específica.

La inhibición de la adherencia de una célula sanguínea o proteína a un tejido biológico se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ensayos para detectar la unión de Iba glicoproteína a un tejido biológico se describen en Simon et al., J. Exp. Med. 192:193-204, 2000, y referencias citadas aquí. En varias modalidades, la unión de una proteína de fusión GPIba inhibe la unión de una célula sanguínea o proteína a un tejido biológico por al menos 30%, 50%, 75%, 90%, 95%, 99% o 99,9%.

También se puede evaluar la adherencia en la condición de mayor o menor que las condiciones de flujo fisiológico, que incluyen condiciones estáticas y aplicación serial de corte y estática. La adherencia se puede determinar por ejemplo colométricamente, fluorométricamente, mediante citometría de .

flujo o utilizando un ensayo de cámara de flujo de placa paralela.

También se incluyen en la invención métodos para tratar desordenes asociados con la activación de plaquetas en un sujeto mediante la administración a un sujeto de un compuesto terapéuticamente y biológicamente activo (de aquí en adelante "terapéutico"). Alternativamente, el sujeto también se le administra uno o más de los siguientes: una estatina, ácido acetilsalicílico (aspirina); heparina (que incluye heparinas de bajo peso molecular o no fraccionadas); antagonistas IIb/IIIa de glicoproteína; clopidogrel; antagonistas de P-selectina; inhibidores de trombina y enzimas trombolíticas.

El sujeto puede ser por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un humano, un primate, un ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo.

Los terapéuticos incluyen, por ejemplo: (i) uno cualquiera o más de polipéptido Iba glicoproteína y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de este; (ii) anticuerpos dirigidos contra polipéptidos Iba glicoproteína descritos en (i) y (iii) ácidos nucleicos que codifican un polipéptido Iba glicoproteína, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos como se describe en (i) anterior.

Esencialmente cualquier desorden que se liga etiológicamente a la activación de plaquetas se considera favorable para la prevención o el tratamiento. El desorden puede ser, por ejemplo, inflamación vascular, arteriosclerosis, restenosis (restenosis relacionada con angioplastia); y/o condición asociada con enfermedad trombótica, por ejemplo, angina, (que incluye angina estable y angina no estable) infarto de miocardio agudo, apoplejía, trombosis venosa o trombosis arterial. La invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1. La sulfatación de tirosina GPIb-Ig juega un papel importante en la unión de trombina pero es menos importante para la unión de vWF

El papel de la región Terminal carboxílica ácida de GPIb α en la unión vWF y trombina se examinó mediante residuos de tiroxina en las posiciones 276, 278, y/o 279 de tres tipos de proteína fusión GPIb α y IgG₁Fc: aquellas con una secuencia GPIb α humana tipo silvestre; una proteína de fusión con la sustitución M239V (IV), y la proteína de fusión con una sustitución G233V M239V (2V) doble. Las proteínas se produjeron en células de ovario de hámster chino (CHO), luego se aislaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de intercambio de anión. Las formas

dimerizadas de las proteínas de fusión en las cuales el estado de sulfatación varió de 0 a 6 se aislaron.

La unión de las isoformas del dominio vWF A1 (A1), para el vWF intacto, y para la α -trombina se examinó utilizando resonancia de superficie de plasmón (BiaCore).

Los polipéptidos 1V y 2V se unen con mayor afinidad significativa al dominio A1 según se comparó con el polipéptido WT. Los polipéptidos 1V y 2V también mostraron significativamente afinidad mejorada para el vWF intacto con relación a la proteína de fusión con la secuencia GPIb α tipo silvestre para el vWF. La K_d para la variante 2V varió de 4 nM a 12 nM, y la K_d para la variante 1V varió de 119 nM a 284 nM para sulfatación completa a isoformas no sulfatadas. La unión del GPIb α al vWF no se detectó bajo las mismas condiciones, lo cual indica un $K_d > 1$ mM. La variación del estado de sulfatación en WT, 1V, y 2V no se correlaciona con cambio significativo en la unión al dominio A1 o vWF intacto. Finalmente, la interacción GPIb α -Ig-vWF exhibió cinéticas lentas prendidas lentas/apagadas típicas de una interacción hidrófoba (K_a y $K_d \sim 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y 10^{-3}s^{-1} , respectivamente).

Para las moléculas GPIb α -Ig239V y GP Ib-Ig2V, la afinidad de unión de la isoforma sulfatada totalmente a trombina fue ~80

veces mayor que aquella de la isoforma no sulfatada (K_D de 0.5 μ M y 40 μ M, respectivamente). Para la unión vWF las moléculas completamente sulfatadas solo fueron 3-4 veces más activas que las formas no sulfatadas de ambos mutantes (K_D = 3.4-15 nM para 2V 6-0 sulfatada, 113-521 nM para 1V 6-0 sulfatada). La relación entre el estado de sulfatación y unión al factor Willebrand y la unión a la trombina también se examinó.

Método de sangrado de cola de rata: Ratas Sprague Dawley machos adultos (lacónicos), que pesan 250-300 gm, se utilizaron. Los animales se equiparon con un catéter de vena yugular mediante el proveedor anterior. Los animales se alojaron en jaulas individuales a temperatura ambiente durante un periodo corto de 12 hr (6:am-6:pm) en nuestras instalaciones animales institucionales y se suministró concentrado para ratones de laboratorio estándar y agua ad libitum. Los animales se aclimataron en su nuevo ambiente al menos tres días después de uso.

Administración de muestra GPIb-Ig y procedimientos de sangrado de vena de cola de rata: En el día del experimento, una extensión de tubo (20 cm de tubo PE 50) con una llave de paso de tres vías y una jeringa de 1-cc llena con 0.9% de solución salina isotónica estéril se agregó al catéter de vena yugular permanente. La muestra de ensayo GPIb-Ig de

depósito se diluyó con solución salina con 0.9% de solución salina isotónica y se administró en dosis indicadas en un volumen de 0.1ml por 100 gm de peso corporal por vía de otro brazo de la llave de paso de 3 vías. El catéter se lavó con 0.2 ml de solución salina. Diez minutos después de la inyección, las ratas se removieron de su jaula y se colocaron gentilmente dentro de un contenedor. El segmento distal 1-2 mm de la cola se transectó utilizando una cuchilla de afeitar y la cola se sumergió rápidamente dentro de un baker de 300 ml prellenado con 0.9% de solución salina isotónica (temperatura 37°C). El tiempo de sangrado se definió como el periodo de tiempo del inicio del sangrado de la cola hasta que cesa completamente el sangrado (no resangrar dentro de 30 segundos una vez se ha detenido el sangrado). Al final del experimento, a las ratas se les aplicó eutanasia mediante inhalación de CO₂.

En el ensayo de sangrado de cola de rata, 10 minutos luego de la dosis i.v. de 200ug/kg, el tiempo de sangrado de 4 minutos se detectó en variantes GPIIb con estado de sulfatación 0, 1, o 2. El tiempo de sangrado se incrementa a medida en que el estado de sulfatación se incrementa a 6, en donde el tiempo de sangrado era de 10 minutos.

Estos datos demuestran que la sulfatación juega un papel en la unión de trombina, pero un papel mucho menor en la unión

vWF. Sin embargo, el estado de sulfatación afecta significativamente la unión a α -trombina. La estequiometría de la unión GPIb α -Ig con trombina fue mayor de 2 α -trombina por GPIb α -Ig. La interacción α -trombina - GPIb α es mucho más sensible al estado de sulfatación GPIb α -Ig comparado con la hidrofobicidad del anillo Cys208-Cys249 de GPIb α , que se une al vWF. Estos resultados indican que el GPIb α contiene dos subdominios funcionalmente distinguibles: uno para la unión vWF y uno para la unión trombina.

Ejemplo 2. Cys 65 en GPIb α se involucra en la agregación

La estructura de cristal revela que el Cys 65 del GPIb α se coloca en la región LRR. La proporción de radio muy baja (cerca de 5%) con sondas tiol-reactivas bajo condiciones nativas demostraron la inaccesibilidad de este residuo Cys. El ensayo Ellman y mapeo nativo del péptido preliminar mostraron que no tiene modificación en Cys65. Sin embargo, aún una muy pequeña cantidad de tiol expuesto puede formar uniones de disulfuro intramolecular y originar agregación. El papel de este residuo en la agregación se examina.

Cuando la muestra GP Ib α se tensionó a 40° C por 80 horas, cerca de 25% del total de proteínas formó agregados. Los agregados fueron reducibles pero la mayoría de SDS fue

estable. La ultracentrifugación analítica indicó que los agregados varían de dímero a octámero. El mapa de péptido achro-K alquilado de los agregados mostró que los péptidos que contienen Cys libre (K4 péptido) desaparecieron en el mapa, lo cual podría formar un péptido grande con otros péptidos que contienen Cys y K4. Para confirmar el papel del Cys libre en la agregación, la muestra GP Ib α se calentó-tensionó en un 1M GnHCL que resulta en la agregación covalente total. En la presencia de un 1M GnHCl, la estructura de la proteína se afloja, exponiendo por lo tanto el Cys65 y acelerando la agregación. Estos datos sugieren que bajo estas condiciones el residuo Cys libre puede ser involucrado en la agregación.

Ejemplo 3. Proteínas de fusión GP Ib α interactúan con el polipéptido vWF

Se examinó la evidencia para una interacción directa entre las variantes de proteína de fusión GP Ib α y el polipéptido vWF.

Las variantes de fusión GP Ib α ensayadas incluyen 1V, 2V, 3V, 3V/C65S, 2V/FFF, y una variante llamada "2V acortado". Las reacciones de control incluyen una proteína GP Ib α de aminoácido 290, un polipéptido vWF solo o un polipéptido de control irrelevante (47.mFc, una proteína de fusión PSGL-1).

Un polipéptido de fusión o control se mezcla con los glóbulos de sefarosa de proteína A, que se une a las porciones de inmunoglobulina de las proteínas de fusión. La unión de proteína de los glóbulos de sefarosa de proteína A se eluyeron y se realizó electroforesis a través de un 3-8% de gel Tris-acetato. El gel fue inmunoteñido con un anticuerpo monoclonal para vWF y detectado el anticuerpo. Los geles se corrieron bajo condiciones de reducción y sin reducción. El procedimiento se desarrolló dos veces.

Los resultados de la unión del fragmento vWF A1 al fragmento vWF intacto se muestran adelante. El vWF muestra la unión más fuerte de las variantes 3V y 3V/65S GP Iba cuando se ensayó bajo condiciones de reducción y sin reducción. También se observó unión fuerte con la variante 2V mientras que se detectó menos unión comparativamente con la variante 1V y la variante 2V/FFF. El polipéptido de tipo silvestre GP Iba mostró unión débil a vWF en estos experimentos.

	1V	2V	3V	2V/FFF	3V/C-S
Constante de unión Vwf A1 (K_A M ⁻¹)	3.6+07	1.9+0.8	1.5E+09	9.1E+07	1.5E+09
Constante de unión Vwf (K_A M ⁻¹)	7.7E+07	5.6E+08	1.7E+09	2.4E+08	1.7E+09

Ejemplo 5: Inhibición in vivo de trombosis de arteria coronaria repetitiva

La capacidad de una proteína de inmunoglobulina Iba de fusión para inhibir la trombosis de arteria coronaria in vivo se determina utilizando el procedimiento descrito por Folts et al., se examina la circulación 54:365-70, 1976. La proteína de fusión incluye una secuencia GP Iba con las sustituciones G233V K237V y M239V con relación a la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:1.

Perros Mongrel, que pesan 20-25kg se anestesian con pentobarbital de sodio (30mg/kg i.v.), luego se entuban y se ventilan con aire de habitación utilizando un respirador. Se colocan catéteres arteriales y venosos. Se aproxima al corazón mediante toracotomía izquierda a través del quinto espacio intercostal. El pericardio se abre y se sutura a los bordes de la herida para proporcionar una cuna sin desplazar el corazón. Cerca de 2cm de la arteria coronaria del circunflejo izquierdo (LCX) se aísla. El flujo medio y dinámico LCX se monitorea continuamente utilizando una celda de flujo ultrasónico perivascular colocada en forma próxima a la arteria. Después de un periodo de estabilización, el endotelio del LCX se adhiere a la compresión final con un hemostato. Se coloca un constrictor plástico distante y sobre

el área del endotelio herido para suministrar aproximadamente 70-80% de estenosis de vaso. Cuando el flujo de sangre se reduce a cero, el flujo de sangre se restaura mediante la agitación del constrictor para arrastrar las plaquetas agregadas. Esto reduce y restaura el flujo sanguíneo se denomina CFR. Al menos cinco CFR consecutivos se registran antes de administrar la droga de ensayo.

Incrementar las cantidades de 3V resulta en un mayor flujo sanguíneo. Estos resultados demuestran que las glicoproteínas de fusión inhiben la trombosis en el modelo animal.

Ejemplo 6. Tratamiento in vivo de un sujeto con angina inestable (UA) o infarto del miocardio elevado sin ST (NSTEMI).

Una variante GPIb α de acuerdo con la invención se administra como una proteína de fusión mediante una inyección de bolo intravenoso sencillo (10 mg) a un paciente con angina inestable o infarto del miocardio elevado sin ST (NSTEMI). El tratamiento con la variante mejora el AU o el NSTEMI. La ristocetina induce el ensayo de agregación de plaquetas (RIPA) se utiliza para monitorear la actividad GPIb-Ig.

Ejemplo 7. Comparación de tiempos de sangrado que utilizan clopidogrel y variantes GPIb α 2V o GPIb α 2V/FFF.

El efecto del tiempo de sangrado se examinó al comparar los tiempos de sangrado en ratas tratadas con clopidogrel y GPIba 2V o dos dosis diferentes de GPIba 2V/FFF, que les falta sitios de unión de trombina.

La variante GPIba se administra intravenosamente dos horas después de administración de clopidogrel (4.3 mg/kg, po). Las variantes GPIba ensayadas incluyen GPIba 2V/FFF GPIb 2V/290 GPIba 2V/290 GPIba 2V/290, GPIba 2V/290/FFF (100 mcg/kg), y GPIba 2V/290 (50 mcg/kg). El RBT se midió 15 minutos después de la administración de la variante GPIba. Seis o siete animales se ensayaron para cada tratamiento.

El tiempo de sangrado se incrementa durante 8.2 minutos (N=7) en ratas tratadas con clopidogrel solo a 24 minutos con ratas tratadas con clopidogrel y 50 mcg/kg de GPIba 2V/290 (N=6). El tiempo de sangrado se incrementó a 13.9 minutos en ratas tratadas con 50 mcg/kg de GPIba 2V/290FFF (N=6), y a 19 minutos en ratas tratadas con 100 mcg/kg de GPIba 2V/290/FFF (N=7). Así, un tiempo de sangrado más corto se observó en animales dado dos veces la dosis del GPIba2V/290/FFF según se comparó con los animales dado la variante GPIba 2V/290.

Ejemplo 8. Comparación de la eficacia antitrombótica de formas sulfatadas y no sulfatadas de quimeras GPIIb solubles recombinantes en un modelo canino de de trombosis de arteria coronaria.

La capacidad de unión del ligando y la eficacia antitrombótica de una quimera GPIIb humana recombinante no sulfatada (GPIIb-290/2V/FFF-Ig) se comparó con aquella de una quimera humana recombinante sulfatada GPIIb (GPIIb-290/2V-Ig).

Las quimeras de GPIIb recombinantes solubles incluyen GPIIb-290/2V-Ig, que consiste de los aminoácidos 290 N-terminal de GPIIb con sustituciones de valina con ganancia de función en las posiciones 233 y 239, fusionadas a un dominio IgG1 Fc humano. Se generó el GPIIb2V/290/FFF al sustituir adicionalmente tres residuos de tirosina (Tyr-276, 278, 279) con fenilalaninas para eliminar la sulfatación.

Las reducciones de flujo cíclico (CFRs) se indujeron mediante herida de choque de la arteria coronaria de circunflexo izquierdo en perros Mongrel machos anestesiados. El flujo sanguíneo coronario se monitoreó constantemente utilizando una sonda de flujo ultrasónico perivascular. La plantilla de tiempo de sangrado se midió en la superficie del labio superior interior utilizando un dispositivo de corte automatizado. La prolongación del tiempo de sangrado

originada por la quimera GPIba no sulfatada y sulfatada se evaluó al utilizar modelos de sangrado de cola de rata. La función de las plaquetas en la sangre completa antes y en varios puntos de tiempo después del tratamiento en modelos Folt se midió con un analizador de plaqueta 100 (PFA-100).

Las capacidades de unión del GPIba 290/2V-Ig y GPIba-290-2V/FFF-Ig al vWF y una trombina se evaluaron in Vitro utilizando un ensayo BiaCore. Los resultados se presentan adelante:

Mutante	Unión vWFA1	Unión trombina
GPIb tipo silvestre	266 nM	0.76 uM
GPIb-290/2V-Ig	5 nM	0.63 uM
GPIb-290/2V/FFF-Ig	15.4 nM	35.8 uM

El efecto del tipo silvestre, o las quimeras GPIb en la agregación de plaquetas humanas que inducen ristocetina se muestran en las figuras 1A-1D. Se muestra el GPIba de tipo silvestre ("Normal"), GPIb-Ig WT, GPIba-290/2V-Ig, y GPIba-290/2V/FFF-Ig.

La dosis GPIba-290/2V-Ig ("2V") y GPIba-290/2V/FFF-Ig ("FFF") en un modelo Folt de trombosis coronaria se muestra adelante. Una calificación de 4 se dio en CFR que fue eliminado, y una calificación de 3 se dio en la CFR que no fue completamente

abolido pero la coronaria fue capaz de abrirse espontáneamente.

2V (ug/kg, iv)	Calificación de respuesta	BT (min)	FFF (ug/kg, iv)	Calificación de respuesta	BT (min)
50	4 (6/6)	2.0	50	3 (3/3)	2.4
100	4 (6/6)	3.7	100	4 (3/3)	2.3
-	-	-	200	4 (3/3)	3.1
500	4 (2/2)	10.25	500	4 (3/3)	5.4

La prolongación del tiempo del sangrado de la cola de rata originado por el GPIb-290/2V-Ig ("2V") y GPIb-290/2V/FFF-Ig también se examinó:

2V (ug/kg, iv)	BT Media ($\pm$ SE)	N	FFF (ug/kg, iv)	BT Media ($\pm$ SE)	N
50	3.1 $\pm$ 0.6	8	100	3.3 $\pm$ 0.4	6
100	4.6 $\pm$ 0.8	8	200	4.9 $\pm$ 0.2	7
200	8.9 $\pm$ 1.1	7	500	8.7 $\pm$ 0.7	7

La figura 2 es una gráfica que muestra la eficacia antitrombótica de las quimeras GPIb α en un modelo canino de Folt de trombosis coronaria (eje y: sangre LCX).

La figura 3 es una gráfica que muestra la inhibición de la función de plaquetas por GPIb 290/2V-Ig y GPIb 290/2V/FFF-Ig en un modelo canino de trombosis coronaria evaluado por PFA-100.

Estos resultados demuestran que la conversión de seis tirosinas sulfatadas a fenilalaninas reducen el dominio vWF A1 de unión por ~ de estos estudios y casi completamente aprobó la unión de trombina. El GPIb 290/2V/FFF-Ig demuestra un 50% de reducción en la potencia como se comparó con el GPIb 290/2V-Ig reducción de flujo cíclico, prolongación de tiempo de sangrado y tiempos de cierre ADP evaluados utilizando un PFA-100. La prevención de formación de trombos arteriales por las quimeras GPIba en estas dosis ocurre por vía de la inhibición del dominio vWF A1 y su actividad es independiente de una unión de trombina.

OTRAS MODALIDADES

Mientras la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de esta, la anterior descripción se pretende que ilustre y no limite el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácido con uno a 20 sustituciones de aminoácido, eliminaciones o inserciones relacionadas con 1-290 aminoácidos de una secuencia de proteína GPIb α humano (ID de Sec. No.:1) en donde dicho polipéptido tiene al menos una actividad seleccionada del grupo que consiste de:

Afinidad inferior de unión a α trombina relacionada con la unión a α trombina que comprende un polipéptido de la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:2; y

Agregación reducida relacionada con la agregación de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido ID de Sec. No.:2;

Resistencia incrementada a la proteólisis que un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:2.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho primer polipéptido no tiene más de 15 sustituciones, inserciones o eliminaciones relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho primer polipéptido no tiene más de 12 sustituciones, inserciones o eliminaciones relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido no tiene más de 10 sustituciones, inserciones o eliminaciones relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido no tiene más de 5 sustituciones, inserciones o eliminaciones relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.
6. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido se une con afinidad reducida a α trombina

relacionada con la unión de α trombina de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:1 o de la ID de Sec. No.:2.

7. El polipéptido de la reivindicación 6, en donde dicho polipéptido comprende al menos una de las sustituciones de aminoácido Y276F, Y278F, Y279V, o variantes conservadoras de estas relacionadas con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:2.
8. El polipéptido de la reivindicación 6, en donde dicho polipéptido comprende al menos dos de las sustituciones de aminoácido Y276F, Y278F, Y279V, o una variante conservadora de esta, relacionada con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:2.
9. El polipéptido de la reivindicación 6, en donde dicho polipéptido comprende las sustituciones de aminoácido Y276F, Y278F, Y279V, o una variante conservadora de esta relacionada con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:2.
10. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la agregación de dicho polipéptido es reducida en relación con la agregación de un polipéptido que

comprende la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:2.

11. El polipéptido de la reivindicación 10, en donde dicho polipéptido comprende la sustitución de aminoácido C65S, o una variante conservadora de este relacionada con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:2.
 12. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es más resistente a la proteólisis que un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de la ID de Sec. No.:2.
 13. El polipéptido de la reivindicación 12, en donde dicho polipéptido comprende la sustitución de aminoácido K237V, o una variante conservadora de este relacionada con la secuencia de aminoácidos de la ID de Sec. No.:2.
 14. Un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos con 1 a 10 sustituciones, inserciones o eliminaciones relacionadas con aminoácidos 1-290 de la ID de Sec. No.:2, dado que dicha secuencia de aminoácido incluye 233V, 239V, y comprende la sustitución de aminoácido Y276F.
-

15. El polipéptido de la reivindicación 14, en donde dicha secuencia de aminoácido comprende la sustitución de aminoácido K237V.
16. El polipéptido de la reivindicación 14, en donde dicha secuencia de aminoácido comprende la sustitución de aminoácido C65S.
17. El polipéptido de la reivindicación 14, en donde dicha secuencia de aminoácido comprende además la sustitución de aminoácido Y278F o Y279F.
18. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de aminoácido comprende además las sustituciones de aminoácido Y278F y Y279F.
19. El polipéptido de la reivindicación 18, que comprende además la sustitución de aminoácido K237V.
20. El polipéptido de la reivindicación 19, que comprende además la sustitución de aminoácido C65S.
21. El polipéptido de la reivindicación 14, en donde dicho polipéptido se une con mayor afinidad a un factor Willebrand que a un polipéptido que comprende

la secuencia de aminoácido ID de Sec. No.:1 o ID de Sec.: 2.

22. Un polipéptido que comprende uno o más sustituciones en la secuencia de aminoácidos ID de Sec. No.: 2, en donde dicha una o más sustituciones es:

Y276F

Y276F K237V;

Y276F C65S;

Y276F Y278F Y279F;

Y276F Y278F Y279F K237V; o

Y276F Y278F Y279F K237V C65S.

23. Un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 ligado a un segundo polipéptido.

24. El polipéptido de la reivindicación 23, en donde dicho segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada.

25. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde dicho segundo polipéptido comprende una cadena pesada de inmunoglobulina.

26. El polipéptido de fusión de la reivindicación 25, en donde dicho segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina tipo silvestre.
27. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde dicho segundo polipéptido se une con baja o ninguna afinidad a un receptor Fc.
28. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde dicho segundo polipéptido se une con baja o ninguna afinidad a la proteína de complemento C1q.
29. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde dicho segundo polipéptido comprende una región de un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada.
30. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde dicho segundo polipéptido comprende una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.
31. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde dicho segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina tipo silvestre.

32. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, en donde el segundo polipéptido comprende la secuencia de la ID de Sec. No.:3.
33. El polipéptido de fusión de la reivindicación 24, que comprende además una secuencia de señal.
34. El polipéptido de fusión de la reivindicación 33, en donde dicha secuencia de señal comprende la secuencia
MPLLLLLLLLLPSPLHP (ID de Sec. No.:8) o
MPLQLLLLLLILLGPGNSLQL WDTWADEAEK ALGPLLARDR R (ID de Sec. No.:9).
35. Un polipéptido multimérico que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 24.
36. El polipéptido multimérico de la reivindicación 35, en donde dicho polipéptido multimérico es dímero.
37. Una molécula de ADN que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.
38. Un vector comprende el ADN de la reivindicación 37.
39. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 38.

40. Un método para expresar el polipéptido de fusión inmunoglobulina - polipéptido Iba glicoproteína, el método comprende cultivar la célula de la reivindicación 39 bajo condiciones que resultan en la expresión de dicho polipéptido de fusión de inmunoglobulina - polipéptido Iba glicoproteína,
41. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1.
42. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 23.
43. Un método para inhibir la adherencia de una célula sanguínea a un tejido biológico en un sistema biológico, el método comprende en agregar a dicho sistema biológico el polipéptido de fusión de la reivindicación 23 en una cantidad suficiente para inhibir la adherencia de dicha célula sanguínea a dicho tejido biológico.
44. El método de la reivindicación 43, en donde dicho sistema biológico es un sistema in vitro.

45. El método de la reivindicación 43, en donde dicho sistema biológico es un sistema ex vivo.

46. El método de la reivindicación 43, en donde dicho sistema biológico es un sistema in vivo

47. El método de la reivindicación 43, en donde dicha célula sanguínea es una plaqueta.

48. El método de la reivindicación 47, en donde dicha plaqueta expresa Iba glicoproteína, P-selectina o trombina.

49. El método de la reivindicación 43, en donde dicha célula sanguínea es un leucocito.

50. El método de la reivindicación 49, en donde dicho leucocito expresa Mac-1 o un ligando selectina.

51. El método de la reivindicación 49, en donde dicho tejido biológico se compleja con el factor Willebrand, trombina, Iba glicoproteína, o P-selectina.

52. Un método para inhibir la adherencia de una proteína a un tejido biológico en un sistema biológico, el método comprende agregar a dicho sistema biológico el

polipéptido de fusión de la reivindicación 1 en una cantidad suficiente para inhibir la adherencia de dicha proteína a dicho tejido biológico.

53. El método de la reivindicación 52, en donde dicho sistema biológico es un sistema in Vitro.

54. El método de la reivindicación 52, en donde dicho sistema biológico es un sistema ex vivo.

55. El método de la reivindicación 52, en donde dicho sistema biológico es un sistema in Vivo.

56. El método de la reivindicación 52, en donde dicha proteína es una membrana asociada.

57. El método de la reivindicación 52, en donde dicha proteína es Iba glicoproteína, P-selectina, factor von Willebrand o trombina.

58. El método de la reivindicación 52, en donde dicha proteína está en solución.

59. El método de la reivindicación 58, en donde dicha proteína es factor von Willebrand o trombina.

60. El método de la reivindicación 52, en donde dicho tejido biológico se compleja con una proteína seleccionada del grupo que consiste de Iba glicoproteína, Mac-1, P-selectina, Factor von Willebrand y trombina.

61. Un método que comprende un desorden asociado con activación de plaquetas en un sujeto, el método comprende administrar a un sujeto sin necesidad de este el polipéptido de la fusión de la reivindicación 1.

62. El método de la reivindicación 61, en donde dicho desorden se asocia con enfermedad trombótica.

63. El método de la reivindicación 61, en donde dicho desorden es enfermedad isquémica cardiaca, angina, infarto agudo del miocardio, apoplejía, trombosis venosa, aterosclerosis, o trombosis arterial.

64. El método de la reivindicación 61, en donde dicho desorden es angina.

65. El método de la reivindicación 64, en donde dicha angina es angina inestable.

66. El método de la reivindicación 61, en donde dicho sujeto es humano.

67. El método de la reivindicación 61, comprende además administrar a dicho sujeto un compuesto seleccionado del grupo que consiste de ácido acetilsalicílico, heparina, un antagonista IIb/IIIa, clopidogrel, un antagonista de P-selectina, un inhibidor de trombina y una enzima trombolítica.

68. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácido con 1 a 20 sustituciones de aminoácidos, eliminaciones o inserciones relacionadas con 1-290 aminoácidos de una secuencia de proteína GPIb2V humana (ID de Sec. No.:2), en donde dicho primer polipéptido se une con mayor afinidad al factor von Willebrand que comprende un polipéptido de ID de Sec. No.:2.

69. La proteína de la reivindicación 68, en donde dicha proteína es una proteína de fusión.

70. La proteína de la reivindicación 1, en donde dicha proteína es una proteína de fusión.

71. La proteína de fusión de la reivindicación 70, comprende una región de una inmunoglobulina.

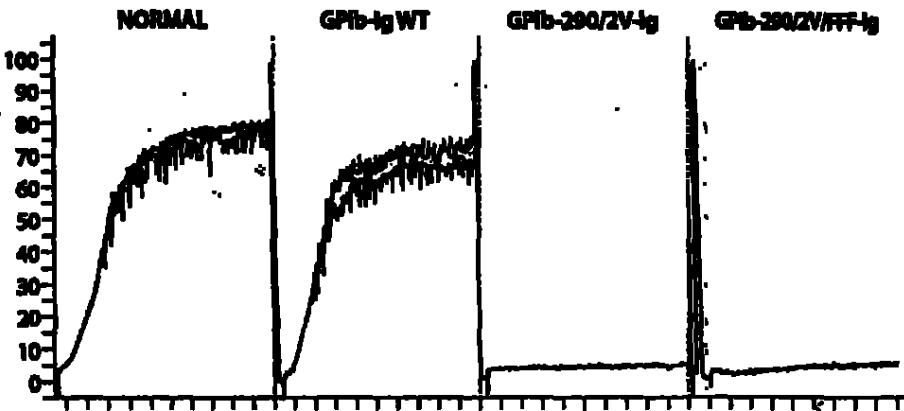


Fig. 1

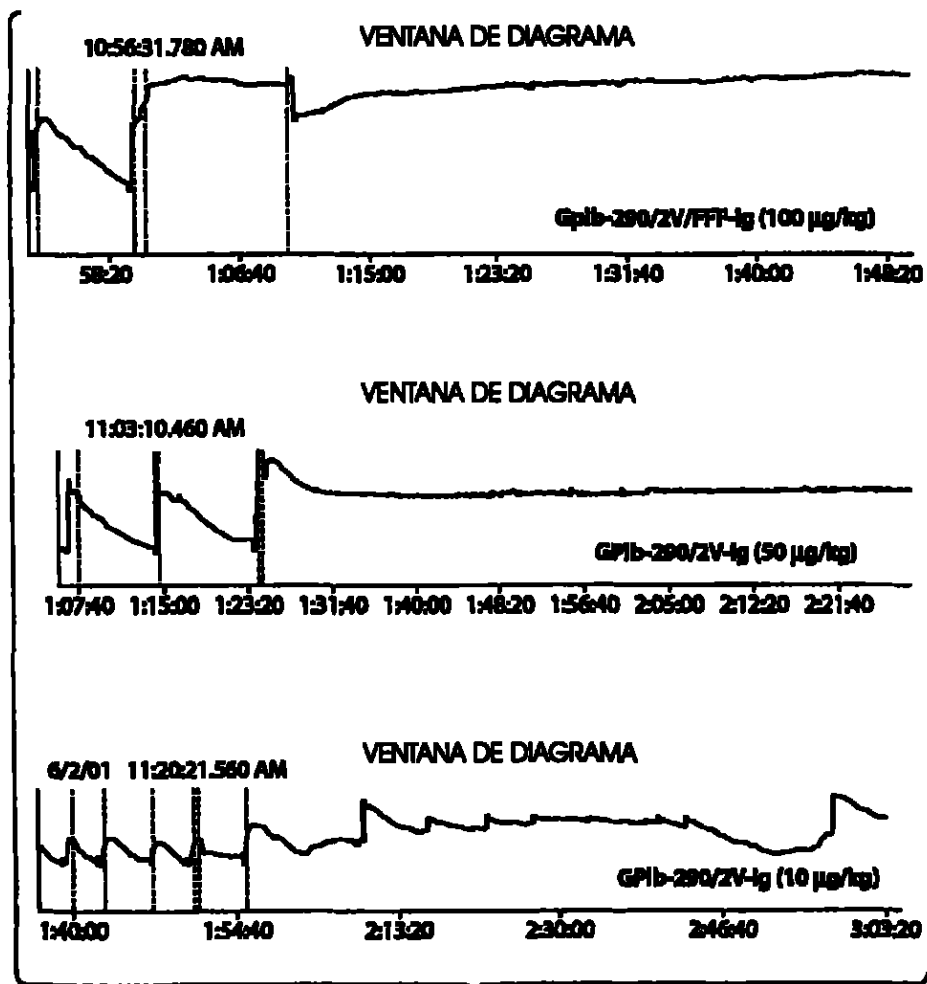


Fig. 2

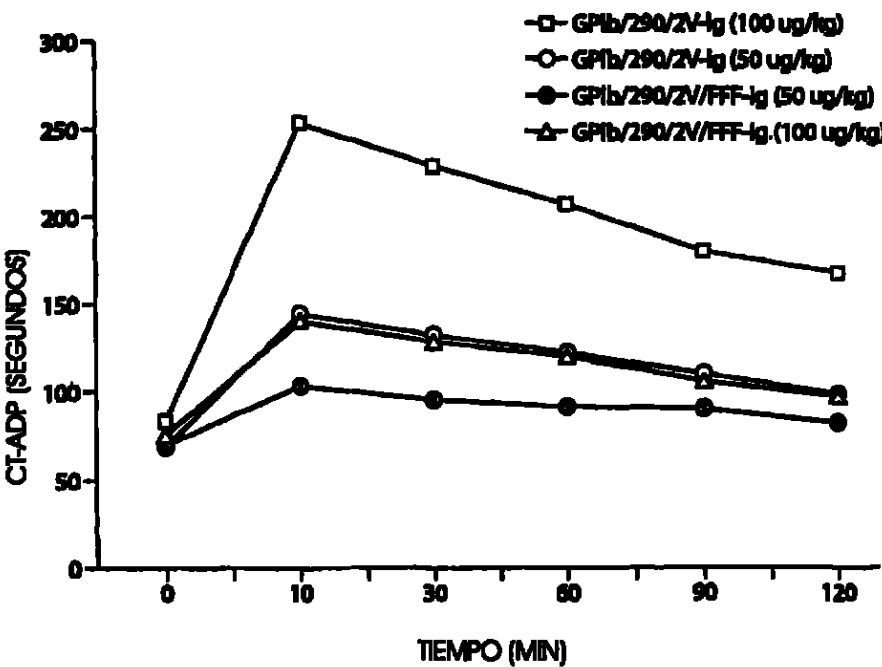


Fig. 3

54

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> PLATELET GLYCOPROTEIN IB ALPHA VARIANT FUSION
POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 22058-583-061

<140> Not Yet Assigned

<141> 2004-06-14

<150> 60/477,525

<151> 2003-06-11

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His	Pro	Ile	Cys	Glu	Val	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Val	Asn	1	5	10	15
Cys	Asp	Lys	Arg	Asn	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	20	25	30	
Thr	Thr	Ile	Leu	His	Leu	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Leu	35	40	45	
Ala	Thr	Leu	Met	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Asp	Arg	50	55	60	
Cys	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	65	70	75	80
Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	85	90	95	
Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	100	105	110	
Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu	115	120	125	
Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu	130	135	140	
Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu	145	150	155	160
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	165	170	175	
Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ile	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe	180	185	190	

92

Gly	Ser	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Pro	Trp	Leu
195							200					205			
Cys	Asn	Cys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Ala
210						215					220				
Glu	Asn	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Lys	Ala	Met	Thr
225					230					235					240
Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Val	Gln	Cys	Asp	Asn	Ser	Asp	Lys	Phe	Pro	Val
				245					250					255	
Tyr	Lys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Cys	Pro	Thr	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp
			260					265					270		
Thr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys
		275					280					285			
Val	Arg														
290															

<210> 2
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

His	Pro	Ile	Cys	Glu	Val	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Val	Asn
1					5				10					15	
Cys	Asp	Lys	Arg	Asn	Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp
			20					25					30		
Thr	Thr	Ile	Leu	His	Leu	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Leu
		35					40					45			
Ala	Thr	Leu	Met	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Asn	Leu	Asp	Arg
	50					55					60				
Cys	Glu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Gly
65					70					75					80
Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly
				85					90						95
Gln	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu
			100						105				110		
Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu
		115					120					125			
Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu
	130					135					140				
Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu
145					150					155					160
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr
				165					170					175	

137

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

<210> 3
<211> 302
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15
Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30
Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45
Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60
Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80
Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95
Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110
Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
115 120 125
Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140
Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Gly Val Asp Val Lys Ala Met Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg Ala Thr Arg Thr Val Val Lys Phe Pro Thr Lys Ala
290 295 300

<210> 4
<211> 302
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60

Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140

251

Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu
145					150					155					160
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr
				165					170					175	
Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ile	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe
			180					185					190		
Gly	Ser	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Pro	Trp	Leu
		195					200					205			
Cys	Asn	Cys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Ala
	210					215					220				
Glu	Asn	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Lys	Ala	Met	Thr
225					230					235					240
Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Val	Gln	Cys	Asp	Asn	Ser	Asp	Lys	Phe	Pro	Val
				245					250					255	
Tyr	Lys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Cys	Pro	Thr	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp
			260					265					270		
Thr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys
		275					280					285			
Val	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Val	Val	Lys	Phe	Pro	Thr	Lys	Ala		
	290					295					300				

<210> 5
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15
 Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60
 Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95
 Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110
 Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Val Val Asp Val Lys Ala Val Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp Thr
260 265 270

Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys Val
275 280 285

Ala Ala Thr Ala Thr Val Val Lys Phe Pro Thr Lys Ala
290 295 300

<210> 6
<211> 290
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60

Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110

131

Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Gln	Glu
		115						120					125		
Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Leu
		130				135					140				
Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn	Asn	Leu
		145				150				155					160
Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr
				165					170					175	
Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ile	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe
			180					185					190		
Gly	Ser	His	Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Pro	Trp	Leu
		195					200					205			
Cys	Asn	Cys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Ala
		210				215					220				
Glu	Asn	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Gln	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Ala	Met	Thr
					230					235					240
Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Val	Gln	Cys	Asp	Asn	Ser	Asp	Lys	Phe	Pro	Val
				245					250					255	
Tyr	Lys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Cys	Pro	Thr	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp
			260					265					270		
Thr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys
		275					280					285			
Val	Arg														
		290													

<210> 7
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr
 1 5 10 15
 Glu Pro Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val
 20 25 30
 Asn Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys
 35 40 45
 Asp Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser
 50 55 60
 Leu Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp
 65 70 75 80
 Arg Cys Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu
 85 90 95

23

Gly Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu	100	105	110
Gly Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg	115	120	125
Leu Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln	130	135	140
Glu Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu	145	150	155
Leu Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn	165	170	175
Leu Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp	180	185	190
Thr Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe	195	200	205
Phe Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp	210	215	220
Leu Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn	225	230	235
Ala Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Val Val Asp Val Lys Ala Val	245	250	255
Thr Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro	260	265	270
Val Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly	275	280	285
Asp Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp	290	295	300
Lys Val Arg	305		

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: heterologous
 signal sequence

<400> 8
 Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

12

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heterologous
signal sequence

<400> 9

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
20 25 30

Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg
35 40

<210> 10

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205

h371

Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
210						215					220				

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 06001981 00000000 Folios: 144
Fecha (AMB): 2006-01-11 16:52:32
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DE TRAMITE

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO(COPIA)
Radicación : 06001981 00000000 Folios: 144
Fecha (AMB): 2006-01-11 16:52:32
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION *PCT* **MODELO DE UTILIDAD**

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. () ()
- Descripción de la invención. () ()
- Dibujos de ser estos pertinentes. () ()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () **INCOMPLETA** () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. () ()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () **INCOMPLETA** () ()

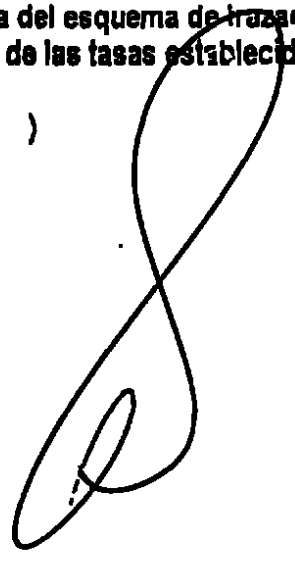
ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. () ()
- Representación gráfica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () **INCOMPLETA** () ()

Firma Responsable:

Fecha:



146

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D'ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

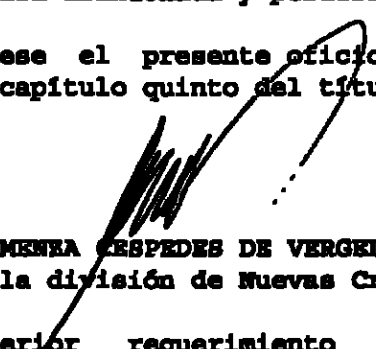
REFERENCIA Radicación No. 6 1981
 Solicitud internacional US2004/019057
 Fecha inicio fase nacional 11/01/2006
 Trámite 11
 Evento 378
 Actuación 430
 Oficio No. 3150

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CRESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 07 MAR 2006
jramos