

## Anticorps recombinants antithrombotiques

par Julien Muzard\*,\*\*, Stéphane Loyau\*, Nadine Ajzenberg\*, Philippe Billiald\*\*  
& Martine Jandrot-Perrus\*

\*Inserm, U698, Hôpital Bichat, 46, rue Henri Huchard, 75877 Paris cedex 18; \*\*Muséum d'Histoire Naturelle, USM 505-CP 39, 12, rue Buffon 75005 Paris. Correspondance : mjandrot@bichat.inserm.fr

Reçu le 19 janvier 2007

### RÉSUMÉ

Les accidents coronariens et cérébrovasculaires aigus sont la première cause de mortalité dans le monde et vont le rester au moins jusqu'en 2020. Les maladies cardiovasculaires (ischémie myocardique et cérébrale) tuent environ 17 millions de personnes par an avec un accroissement prévu à 20 millions par an en 2020 et 24 millions par an en 2030. L'incidence globale des récidives et décès dans les 6 mois suivant un syndrome coronarien aigu reste de 8 à 15 % en l'état actuel de la pratique médicale. Les accidents cardiovasculaires sont dus à la formation d'un *thrombus* en regard d'une lésion athéromateuse érodée. Les traitements de la thrombose sont médicaux, associant fibrinolytiques, anticoagulants et anti-plaquettaires, et mécanique par angioplastie coronaire pour recanaliser l'artère coronaire. Mais ces traitements n'évitent pas une morbi-mortalité de l'ordre de 15 % à 6 mois. Enfin, le traitement des accidents vasculaires cérébraux ischémiques reste très limité. Il y a donc, malgré les progrès des traitements antithrombotiques, un vrai besoin clinique d'amélioration et de décou-

verte de nouvelles molécules en raison des limites des drogues existantes.

L'activation des plaquettes a un rôle critique dans l'étiologie des maladies cardiovasculaires ischémiantes. De ce fait les molécules antiplaquettaires sont le plus fréquemment prescrites dans ces indications. Un seul anticorps recombinant est actuellement utilisé en thérapie antithrombotique. Il s'agit d'un Fab chimérique, c7E3 ou abciximab, qui inhibe la phase finale de l'agrégation plaquettaire. Les indications de l'abciximab sont limitées aux accidents coronariens aigus traités par angioplastie et il présente des effets secondaires, hémorragies et thrombopénies, qui peuvent être sévères. D'autres cibles dont le rôle est plus précoce dans l'activation plaquettaire ont été identifiées. Il s'agit des phases de contact des plaquettes avec le sous-endothélium et de la phase d'activation des plaquettes par le collagène. Des anticorps monoclonaux actifs sur ces voies sont en développement et sont décrits dans cette revue.

### SUMMARY Antithrombotic recombinant antibodies

Coronary syndromes, stroke and other ischaemic arterial diseases are the leading cause of death in the world and will probably remain it at least until 2020. Cardiovascular diseases kill ~ 17 million people each year with an expected increase to 20 million in 2020 and 24 million in 2030. The global impact of recurrence and death during the 6 months following an acute coronary syndrome remains at 8-15 % in the present state of medical practice. Acute ischaemic syndromes have a common aetiology that is the formation of a platelet-rich clot at the site of severe coronary stenosis and of eroded atherosclerotic plaques. Therapy consists of medical treatments associating thrombolysis, antiplatelet drugs, and the re-opening of the coronary artery by angioplasty. But these treatments do not prevent morbidity and mortality reaching ~ 15 % at 6 months. Finally the treatment of stroke is very limited. There is thus a real clinical

need to improve existing treatments and to discover new molecules.

Platelet activation is a critical step in ischaemic cardiovascular diseases. This is the reason why anti-platelet drugs are most often prescribed in these cases. Currently, only one recombinant antithrombotic antibody is used in therapy. This is a chimeric Fab, c7E3 or abciximab, which inhibits the final phase of platelet aggregation. Abciximab is prescribed in acute coronary syndromes treated by angioplasty. However, treatment by abciximab can induce severe complications, principally, hemorrhages and thrombopenia. Other platelet receptors involved in the earlier steps of platelet activation, such as the phases of contact with and of activation by the subendothelium matrix, have been identified as potential targets for the development of antithrombotic antibodies and are described in this review.

## INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde industrialisé. La formation d'un thrombus artériel occlusif au niveau de la plaque d'athérosclérose érodée ou rompue est à l'origine d'accidents ischémiques aigus, infarctus et accidents vasculaires cérébraux et l'association thrombose-remodelage vasculaire est responsable de lésions ischémiques chroniques: angor, ischémie des membres inférieurs. De plus l'incidence globale des récurrences et décès dans les six mois qui suivent un premier incident reste de 8 à 15 % malgré les progrès des traitements. Le traitement des accidents aigus par angioplastie coronaire avec pose de stent est très efficace pour restaurer en urgence le flux coronaire mais le taux de morbidité/ mortalité reste de ~ 15 % après six mois. Les traitements fibrinolytiques donnent des résultats encore moins satisfaisants. Dans le cas des accidents vasculaires cérébraux, les traitements sont encore plus limités. Il existe donc un besoin réel et pressant d'améliorer le traitement antithrombotique des maladies cardiovasculaires. Un antithrombotique idéal devrait inhiber la formation de *thrombi* indésirables sans affecter l'hémostase normale, ni induire de saignement. Il devrait avoir une durée de vie suffisante pour éviter des administrations récurrentes et être administrable *per os*. La drogue devrait avoir une gamme de doses thérapeutiques sûre et large et être dénuée d'effets secondaires et d'immunogénicité. Et le tout de préférence pour un coût faible.

La formation d'un thrombus stable repose sur l'activation coordonnée des plaquettes sanguines et de la cascade de la coagulation. Néanmoins il est clair que les plaquettes jouent un rôle prépondérant dans la thrombose artérielle et dans le remodelage vasculaire. Les plaquettes sont donc une cible privilégiée pour le développement de molécules thérapeutiques. L'activation des plaquettes est un processus complexe dans lequel plusieurs voies de signalisation coopèrent. Elle se décompose schématiquement en étapes successives : les plaquettes entrent en contact avec la lésion, elles roulent à sa surface ; ce ralentissement leur permet d'interagir avec les molécules d'adhérence exposées par la lésion ; elles sont alors activées et libèrent des agonistes solubles qui agissent sur les plaquettes circulantes et les recrutent. L'étape finale commune est l'agrégation des plaquettes. Des modifications membranaires conduisent à l'exposition de phospholipides procoagulants et à l'émission de microparticules prothrombotiques ; la libération de cytokines et de facteurs de croissance concourt à la réaction inflammatoire et au remodelage de la paroi.

Les drogues antiplaquettaires classiquement et largement utilisées, aspirine et clopidogrel (Plavix®) agissent sur une voie d'activation spécifique (respectivement le thromboxane A2 et l'ADP) et ont une efficacité limitée. Le développement et l'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant l'étape finale de l'agrégation est apparu attractif et a été couronné de succès.

Un seul anticorps recombinant est actuellement utilisé en thérapeutique mais plusieurs anticorps dirigés contre

différentes cibles sont en cours d'étude. Cette revue a pour objectif de tenter de répertorier et de décrire ceux pour lesquels des résultats sont accessibles.

## ANTICORPS ANTIAGRÉGANTS PLAQUETTAIRES

L'agrégation des plaquettes résulte de l'activation de GPIIb/IIIa (intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) et de sa liaison au fibrinogène quel que soit le stimulus. GPIIb/IIIa, composée de deux sous-unités ( $\alpha$ IIb et  $\beta$ 3), est uniquement exprimée par les plaquettes et par leurs précurseurs, les mégacaryocytes (Bennett, 2005). Elle est le récepteur le plus abondant à la surface plaquettaire avec 50 000 à 70 000 copies. Lors de l'activation des plaquettes, GPIIb/IIIa passe d'une conformation inactive à une conformation active permettant la liaison du fibrinogène et le pool intracellulaire de GPIIb/IIIa est exposé à la surface. Le fibrinogène est le principal ligand de GPIIb/IIIa dans l'agrégation plaquettaire. Il est d'origine plasmatique et un pool intraplaquettaire est également libéré lors de l'activation. Le facteur von Willebrand (vWF) se lie aussi à GPIIb/IIIa activée et peut contribuer à l'agrégation plaquettaire. Le rôle clé de GPIIb/IIIa dans l'agrégation et la thrombose est illustré par la thrombasthénie de Glanzmann, syndrome hémorragique dû à un déficit quantitatif ou fonctionnel de GPIIb/IIIa (Nurden, 2006). Les souris déficientes en  $\beta$ 3 souffrent de désordres hémorragiques et sont protégées de la thrombose dans différents modèles expérimentaux (Hodivala-Dilke *et al.*, 1999). Le même effet est observé chez des souris traitées par un anticorps monoclonal anti-GPIIb/IIIa (Smyth *et al.*, 2001). Le rôle essentiel de GPIIb/IIIa dans la thrombose plaquettaire en fait une cible pharmacologique de choix.

De nombreux anticorps monoclonaux (Moab) anti GPIIb/IIIa ont été produits dont certains abolissent l'agrégation des plaquettes *in vitro*. Pour un petit nombre d'entre eux, un effet antithrombotique *in vivo* chez l'animal et plus rarement chez l'homme a été rapporté. Un seul a été utilisé pour développer une drogue.

Les Moab obtenus par injection de plaquettes humaines à des souris, AP-2, LJ-CP8 et MA-16N7C2, sont efficaces dans des modèles de thrombose chez le babouin mais provoquent une thrombopénie et/ou un allongement exagéré du temps de saignement (Hanson *et al.*, 1988 ; Krupsk *et al.*, 1993). Les fragments de deux Moab, le F(ab')<sub>2</sub> CRC64 (FRaMon) et le F(ab')<sub>2</sub> humanisé par greffe de CDR YM337, inhibent l'agrégation plaquettaire *in vitro* et *ex vivo*. Ils n'ont été testés que sur de petites séries chez l'Homme (FRaMon dans l'angioplastie à haut risque et YM337 chez des sujets sains) (Harder *et al.*, 1999 ; Mazurov *et al.*, 2002).

Les Moab 7E3 et 10E5 obtenus dans les années 80 par B.S. Coller sont inhibiteurs de la liaison du fibrinogène et du vWF à GPIIb/IIIa activée et de l'agrégation des plaquettes humaines *in vitro* (Coller *et al.*, 1983). Seul 7E3 présentait une réaction croisée avec GPIIb/IIIa de chien, animal alors le plus utilisé pour les modèles de thrombose. Les études *ex vivo* montrèrent que l'agrégation plaquettaire était inhibée par les F(ab')<sub>2</sub> de 7E3 dès

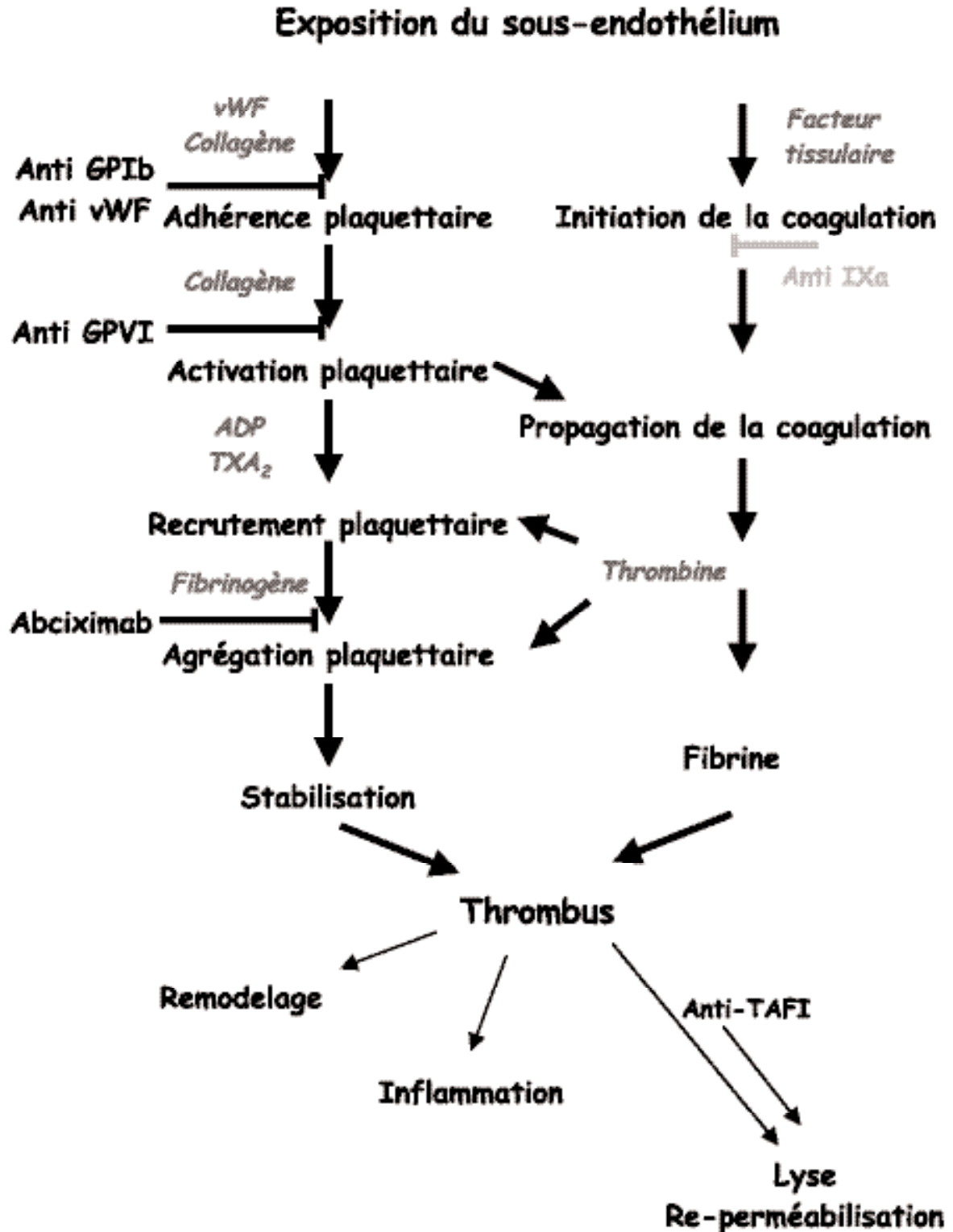


FIG. 1. – Étapes de la formation d'un thrombus à la surface d'une lésion vasculaire. Le thrombus plaquettaire et la fibrine se forment simultanément par des voies ayant de nombreux points de communication. Dans des conditions de flux artériel et en particulier dans les artères sténosées, l'activation de plaquettes est la voie prédominante alors que dans les conditions de flux veineux, la coagulation est plus importante.

Les étapes cibles de l'anticorps thérapeutiques utilisés en clinique (abciximab) et de ceux en cours d'études (anti GPIb, anti vWF, anti GPVI, anti IXa, anti TAFI) sont indiquées.

qu'ils occupaient 50 % des récepteurs GPIIb/IIIa. Une très bonne efficacité antithrombotique des F(ab')<sub>2</sub> dans le modèle de Folts chez le chien, à la dose de 0,7 à 0,8 mg/kg IV (Coller *et al.*, 1986, 1989), était observée ainsi que chez le singe *Cynomolgus* (Coller *et al.*, 1989). Un effet protecteur majeur des F(ab')<sub>2</sub> 7E3 était également observé lors de la thrombolyse chez le chien en favorisant la dissolution des caillots par les agents thrombolytiques (Gold *et al.*, 1988).

Ces étapes démontraient que 7E3 était un candidat sérieux pour réaliser des essais cliniques dans l'angioplastie coronaire, lors de syndromes coronariens aigus. A cette fin, un Fab chimérique (c7E3 Fab, Abciximab, Reopro®) a été produit par fusion des domaines variables de l'anticorps monoclonal de souris aux régions constantes d'une Ig humaine afin de limiter l'immunogénicité du produit. La demi-vie plasmatique de l'abciximab est courte (10 à 30 min) mais la molécule liée aux plaquettes peut être détectée pendant 10 à 14 jours après administration. Son élimination est mal connue (Tcheng *et al.*, 1994).

L'abciximab a reçu l'approbation de la FDA en 1994. A ce jour de nombreux essais cliniques randomisés ont été réalisés impliquant plus de 20 000 patients (De Luca *et al.*, 2005). Ces études indiquent un bénéfice thérapeutique de l'abciximab dans le traitement par angioplastie de l'infarctus du myocarde et des syndromes coronariens aigus avec troponine élevée et traités par angioplastie (prévention des complications ischémiques et réduction de la mortalité) (Kastrati *et al.*, 2006). En revanche l'abciximab n'apporte pas de bénéfice chez les patients qui présentent un syndrome coronarien aigu ne nécessitant pas de geste de revascularisation en urgence.

Cependant l'abciximab a des effets secondaires : risque hémorragique et thrombopénie. Le saignement accru, observé dans certaines études, peut être potentialisé par l'association de l'abciximab et de l'héparine administrés conjointement. Globalement les hémorragies graves représentent moins de 0,2 % dans toutes les études. La thrombopénie est une complication sévère du traitement par abciximab (0,4 à 1,1 % des cas) (Kam & Egan, 2002). Elle survient en général quelques heures après le début du traitement et nécessite son arrêt et éventuellement la transfusion de plaquettes. Le risque est accru lors d'un deuxième traitement (Curtis *et al.*, 2002). Différents types d'anticorps pourraient être à l'origine de la thrombopénie : anticorps reconnaissant des néoantigènes, anticorps naturels reconnaissant les épitopes d'IgG de souris (Christopoulos, 2003). Il est à noter que le coût élevé du traitement (900 à 1200 €/patient) limite de manière importante son utilisation. Ainsi, sur le plan mondial environ 80 % des patients présentant un syndrome coronaire aigu ne le reçoivent pas.

L'abciximab reste le seul anticorps recombinant utilisé en thérapeutique antithrombotique. Il a ouvert la voie à d'autres classes d'antagonistes de GPIIb/IIIa dont le Tirofiban (Aggrastat®) inhibiteur non peptidique et l'Eptifibatide (Integrilin®) peptide cyclique à activité disintégrine. Au stade actuel des études, l'abciximab reste le

plus utilisé et il n'est pas possible de conclure à la supériorité d'une classe par rapport à une autre.

## ANTICORPS INHIBITEURS DE L'ADHÉRENCE PLAQUETTAIRE

Plusieurs récepteurs plaquettaires et ligands vasculaires sont impliqués dans l'adhérence stable des plaquettes au sous-endothélium. Dans des conditions de flux artériel et en particulier lorsque les artères sont sténosées, les plaquettes sont soumises à des taux de cisaillement élevés. Dans ces conditions l'étape initiale de contact avec le sous-endothélium s'effectue *via* la liaison du complexe GPIb/V/IX avec le vWF lié au collagène. Cette première étape permet l'ancrage des plaquettes au collagène par la glycoprotéine VI et l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (GPIIa) et leur activation. C'est cette étape d'activation qui va permettre la libération du contenu des granules plaquettaires, le recrutement d'un nombre suffisant de plaquettes pour constituer des agrégats importants, l'acquisition des propriétés procoagulantes de plaquettes et la stabilisation du thrombus.

L'inhibition de l'adhérence plaquettaire apparaît être une approche prometteuse pour le développement d'agents antithrombotiques dont les bénéfices par rapport aux drogues actuelles seraient les suivants :

- l'adhérence étant la première étape de la formation du thrombus plaquettaire, son inhibition devrait être efficace ;

- la resténose est un problème clinique grave qui survient chez 10 % des patients ayant subi une angioplastie avec pose de stent. Les plaquettes activées libèrent des facteurs de croissance (PDGF) et des cytokines (TGF $\beta$ , IL1, RANTES) qui contribuent à la migration et à la prolifération des cellules musculaires lisses, qui conduisent à la formation de la néointima et qui entretiennent un état inflammatoire. En bloquant l'adhérence stable, la libération de ces facteurs serait inhibée et la resténose prévenue. Effectivement, dans des modèles animaux, l'inhibition du dépôt plaquettaire a un effet bénéfique sur la formation de la néointima.

Plusieurs couples ligands-récepteurs peuvent être ciblés.

### Axe GPIb/V/IX-vWF

L'importance de l'axe GPIb/V/IX-vWF est démontrée par l'existence d'un syndrome hémorragique chez les sujets présentant un déficit quantitatif ou qualitatif en vWF (maladie de Willebrand) ou en GPIb/V/IX (syndrome de Bernard et Soulier) (Ruggeri, 1994 ; Lopez *et al.*, 1998). Les bénéfices d'une inhibition de l'axe GPIb/V/IX-vWF seraient les suivants : *i*) l'interaction GPIb/V/IX-vWF est l'étape initiale de la formation du thrombus artériel ; son inhibition devrait donc être efficace *ii*) l'interaction GPIb/V/IX-vWF se produit uniquement dans des conditions de taux de cisaillement élevés, ce qui limiterait son effet au système artériel en respectant

l'hémostase veineuse et pourrait limiter les risques hémorragiques.

Plusieurs types de molécules inhibent l'interaction GPIb/V/IX-vWF : peptides, protéines de venins de serpent et Moab, ces derniers étant les plus prometteurs pour bloquer l'axe GPIb/V/IX-vWF. Deux types d'anticorps sont décrits : *i*) des anti-GPIb, bloquant la liaison du vWF à GPIb, *ii*) des anti-vWF, bloquant la liaison du vWF soit à GPIb/V/IX soit au collagène.

#### Anticorps anti-GPIb/V/IX

GPIb, GPV et GPIX sont associées dans la proportion de 2/1/2 dans un complexe présent à ~ 12 500 copies à la surface des plaquettes. GPIb est constituée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Le site de liaison du vWF est sur le domaine N-terminal de GPIb $\alpha$  et comporte trois sous-domaines (Cauwenberghs *et al.*, 2000).

Un grand nombre de Moab anti-GPIb inhibiteurs de la liaison au vWF ont été produits et caractérisés *in vitro*. Les problèmes rencontrés pour leur développement ont été l'absence de réactivité croisée avec la GPIb des animaux de laboratoire et l'induction de thrombopénies sévères. Ainsi, AP-1 induit une thrombopénie aiguë

sévère en moins de 5 minutes (Cadroy *et al.*, 1994). D'autres Moab, testés *in vivo*, n'ont pas été développés (PP4-3C ; PG-1).

Deux Moab anti GPIb (6B4 et 24G10) produits par l'équipe de H. Deckmyn, bloquent la liaison du vWF aux plaquettes, l'adhérence au collagène dépendante du vWF et reconnaissent deux régions distinctes du site de liaison du vWF sur GPIb (Cauwenberghs *et al.*, 2001). 6B4 est caractérisé pour son potentiel antithrombotique (Cauwenberghs *et al.*, 2000). Les études *ex vivo* et *in vivo* chez le babouin indiquent que l'IgG induit une thrombopénie aiguë sévère alors que le Fab n'induit qu'une diminution mineure du nombre des plaquettes. De plus le Fab bloquent l'adhérence des plaquettes humaines avec une efficacité qui augmente avec les taux de cisaillement. L'injection de Fab (80 à 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) prévient le dépôt des plaquettes dans un modèle de thrombose sur shunt artério-veineux et l'occlusion cyclique du modèle de Folts (Wu *et al.*, 2002). A ces doses, le Fab 6B4 n'induit pas de thrombopénie ni ne prolonge le temps de saignement. Le taux d'occupation de la GPIb atteint un maximum de 80 %, reste élevé pendant plusieurs heures puis décroît en 24 h.

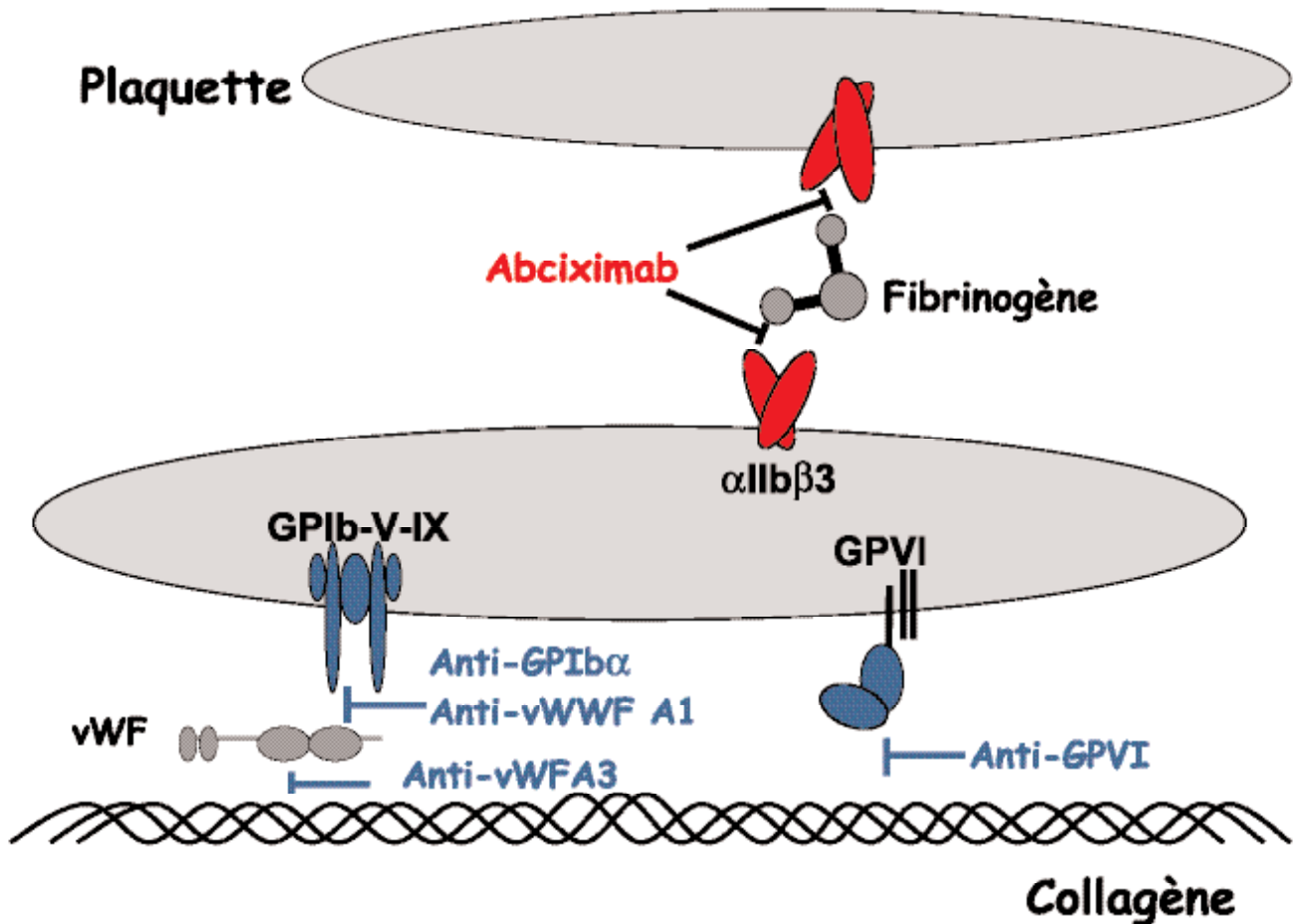


FIG. 2. – Représentation schématique des récepteurs plaquettaires et de leurs ligands qui sont la cible d'anticorps à visée thérapeutique.

L'anticorps 6B4 a été humanisé par re-surfage (Fontayne *et al.*, 2006). La stratégie utilisée a consisté à construire un Fab chimérique dans lequel des domaines variables de 6B4 ont été fusionnés aux domaines constants d'une IgG4 humaine. La construction d'un modèle tridimensionnel a été réalisée après sélection d'Ig présentant un taux d'identité des régions charpentes (FR) supérieur à 75 % et dont la structure avait été obtenue avec une bonne résolution. Un modèle composite a été construit à partir du VL et de VH de deux Ig différentes, remplacement de la boucle H3 de VH, résolution de conflits stériques par minimisation énergétique, adaptations conformationnelles interactives, mutation *in silico*, et re-surfage par remplacement des résidus murins exposés (immunogènes) par des résidus humains. La séquence codante du Fab a été synthétisée de novo. L'affinité du Fab humanisé pour la GPIb est du même ordre que celle de l'IgG parente ( $0,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-8}$  versus  $2,2 \pm 0,6 \cdot 10^{-8}$ ) et ce Fab inhibe la liaison du vWF à GPIb avec la même efficacité. *In vivo*, chez le babouin, il n'a pas d'effet sur la numération plaquettaire et sur le temps de saignement jusqu'à la dose de 1,5 mg/kg. En revanche il inhibe l'interaction GPIb-vWF *ex vivo* de manière corrélée au taux d'occupation de la GPIb plaquettaire. Cette molécule est maintenant en évaluation dans des modèles de thrombose artérielle.

#### Anticorps anti vWF

Le vWF est une glycoprotéine synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Les monomères de ~ 220 kDa s'assemblent dans le Golgi en multimères de grande taille (jusqu'à  $20 \cdot 10^3$  kDa). La sous-unité de vWF est composée de quatre types de domaines (A-D). Le domaine A1 contient le site de liaison à GPIb alors que le domaine A3 contient le site de liaison aux collagènes I et III.

#### Anticorps dirigés contre le domaine A1 du vWF

Bien que plusieurs Moab dirigés contre le domaine A1 aient été décrits comme inhibant la liaison du vWF à GPIb/V/IX, les études démontrant un effet antithrombotique *in vivo* sont rares, en grande partie en raison d'un manque de réaction croisée inter-espèce (Moab712 efficace chez le cobaye ; BB3 BD5 efficace dans un modèle de Folts chez le babouin mais produisant un allongement majeur du temps de saignement (Cadroy *et al.*, 1994). L'anticorps le mieux caractérisé est AJvW2. *In vitro* son effet inhibiteur augmente avec le taux de cisaillement. *In vivo* dans le modèle cobaye, AJvW2 (100-300 µg/kg) inhibe la thrombose sans affecter le temps de saignement (Kageyama *et al.*, 1997). Il est plus efficace sur la thrombose artérielle que sur la thrombose veineuse chez le hamster. Comparé à l'abciximab, le Fab AJvW2 s'est avéré être plus efficace sur la formation du thrombus avec un effet moindre sur le temps de saignement. Un anticorps humanisé (AJW200) a été obtenu par greffe des CDR sur une charpente humaine. L'administration de AJW200 au singe *Cynomolgus* induit *ex vivo* une inhibition prolongée de l'interaction vWF-GPIb. Une fenêtre large entre la dose efficace et celle allon-

geant le temps de saignement est notée. La plus grande efficacité de AJW200 comparé à l'abciximab a été confirmée dans un modèle de Folts chez le chien. AJW200 a été testé dans une population de sujets sains sans provoquer d'effet secondaire mais en inhibant *ex vivo* l'interaction vWF-GPIb (Kageyama *et al.*, 2002). AJW200 ayant fait la preuve de sa bonne tolérance chez l'Homme, sans allongement du temps de saignement, des essais cliniques doivent maintenant démontrer s'il constitue une drogue antithrombotique efficace et sûre.

#### Anticorps dirigés contre le domaine A3 du vWF

L'importance de l'interaction entre le domaine A3 du vWF et le collagène pour l'hémostase est indiquée par le fait que chez une famille atteinte de maladie de Willebrand, le défaut de liaison du vWF au collagène s'accompagne d'un syndrome hémorragique (Ribba *et al.*, 2001). Un antagoniste de la liaison du vWF au collagène pourrait bloquer la formation inappropriée d'un thrombus dans des conditions de taux de cisaillement élevés comme dans des artères sténosées tout en conservant une hémostase normale dans les vaisseaux sains.

Le groupe de H. Deckmyn a produit un anticorps monoclonal (82D6A3) qui inhibe l'interaction entre le vWF et les collagènes fibrillaires de type I et III (Hoylaerts *et al.*, 1997). L'effet inhibiteur s'accroît avec le cisaillement. L'effet antithrombotique de 82D6A3 a été mis en évidence chez le babouin dans le modèle de Folts : à la dose de 0,3 mg/kg ; il abolit la réduction cyclique du flux sans effet sur le temps de saignement et la numération plaquettaire (Wu *et al.*, 2002). *Ex vivo*, une inhibition totale de la liaison du vWF au collagène est atteinte pour un taux d'occupation du vWF de 80 %. Une surdose de 0,6 mg/kg n'induit qu'un faible allongement du temps de saignement, ce composé aurait une zone de sécurité plus large que l'abciximab. Les domaines variables de 82D6A3 ont été humanisés par une méthode de re-surfage proche de celle utilisée pour 6B4. Puis afin d'augmenter la demi-vie et de diminuer l'immunogénicité, ils ont été greffés sur les domaines constants d'une IgG4 humaine. Le Fab ainsi obtenu a une activité *in vitro* comparable à celle de l'IgG parente (Staelens *et al.*, 2006). Son innocuité, sa durée de vie ainsi que son effet antithrombotique sont testés chez le Babouin.

#### Axe GPIa/IIa-collagène

L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (GPIaIIa) présente à la surface de nombreuses cellules est un récepteur de plusieurs types de collagène et de la laminine (Santoro 1986). Un domaine de type I dépendant du  $Mg^{2+}$  de  $\alpha 2$  est responsable de la liaison au collagène. La séquence GFOGER (O = hydroxyproline) joue un rôle prépondérant dans la liaison à  $\alpha 2\beta 1$  qui, comme GPIIbIIIa, est présente sous une conformation de faible affinité sur les plaquettes au repos et devient activée lors de la stimulation des plaquettes. Le rôle de  $\alpha 2\beta 1$  dans l'hémostase est indiqué par l'observation de rares patients présentant un saignement et dont les plaquettes avaient un défaut d'interaction avec

le collagène. De plus des polymorphismes de  $\alpha 2\beta 1$  sont associés à une expression variable du récepteur corrélée aux réponses plaquettaires au collagène. En revanche, les résultats obtenus chez la Souris sont en faveur d'un rôle auxiliaire de  $\alpha 2\beta 1$  dans l'interaction plaquettes/collagène (Holtkotter *et al.*, 2002). L'ensemble des données collectées à ce jour ne permet pas de proposer que l'inhibition pharmacologique de  $\alpha 2\beta 1$  aurait un avantage dans l'arsenal thérapeutique antithrombotique. Il est cependant intéressant de noter que des anticorps spécifiques contre le domaine I de  $\alpha 2$  ont été produits par une approche combinant une vaccination par ADN couplée à la technique de phage display (Hughes *et al.*, 2005).

### Axe GPVI/collagène

L'identification de GPVI comme récepteur majeur d'activation des plaquettes par le collagène a débuté avec l'observation d'un patient chez lequel l'absence totale de réponse plaquettaire au collagène était corrélée à un déficit en GPVI. Le déficit était de cause immunologique et les IgG du patient activaient des plaquettes témoins alors que le Fab inhibait l'activation induite par le collagène (Sugiyama *et al.*, 1987).

L'activation des plaquettes s'opère *via* le regroupement de GPVI par des ligands multivalents comme le collagène fibrillaire, par des peptides synthétiques fibrillaires [(GPO)<sub>n</sub>] ou par une protéine de venin de serpent, la convulxine. GPVI appartient à la super-famille des récepteurs de type immunoglobuline et elle partage d'importantes homologies de séquence avec Fc $\alpha$ RI et LIR1 (Clemetson *et al.*, 1999; Jandrot-Perrus *et al.*, 2000). Elle est exprimée couplée à la chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs des domaines Fc des immunoglobulines, Fc $\gamma$ , sous-unité de signalisation du complexe. L'expression de GPVI est restreinte aux plaquettes et aux mégacaryocytes (Lagrué-Lak-Hal *et al.*, 2001).

L'importance de GPVI dans la thrombose *in vivo* est indiquée par plusieurs études. Des souris déficientes en GPVI sont obtenues par invalidation du gène de Fc $\gamma$  (Berlanga *et al.*, 2002) ou de GPVI (Kato *et al.*, 2003) et par déplétion immunologique (Nieswandt *et al.*, 2001). Le déficit en GPVI s'accompagne d'un défaut majeur de réactivité des plaquettes au collagène *in vitro*. *In vivo*, l'absence de GPVI n'a pas de retentissement hémorragique sérieux et un faible allongement du temps de saignement est noté. En revanche les souris sont protégées vis-à-vis de la thrombose, en particulier dans des modèles de thrombose artérielle proche de l'angioplastie (Konishi *et al.*, 2002). Des résultats variables ont été rapportés quant aux conséquences du déficit en GPVI dans des études de microscopie intravitale mais les lésions induites dans ces modèles (FeCl<sub>3</sub> ou laser) sont assez éloignées de la pathologie artérielle humaine (Konstantinides *et al.*, 2006; Mangin *et al.*, 2006). De manière très intéressante, le déficit en GPVI réduit la réaction inflammatoire au site lésionnel et le développement secondaire de la néointima (Konishi *et al.*, 2002), et protège contre les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique (Takaya *et al.*, 2005). De plus, la GPVI a un

rôle critique dans la thrombose induite par la plaque d'athérosclérose (Cosemans *et al.*, 2005; Penz *et al.*, 2005) et dans l'activation de la coagulation (Lecut *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces observations suggère que des antagonistes de GPVI pourraient avoir une activité anti-thrombotique efficace associée à une relative sûreté d'utilisation. L'interaction GPVI-collagène peut être bloquée par des inhibiteurs agissant soit au niveau du collagène soit au niveau de GPVI. La première approche a été tentée à l'aide d'une molécule constituée du domaine extracellulaire de GPVI fusionné avec les domaines Fc des IgG humaines. Des résultats contradictoires ont été obtenus chez la souris avec cette molécule (Massberg *et al.*, 2004; Gruner *et al.*, 2005) qui, outre le problème de sa taille, a de multiples inconvénients.

La deuxième approche consiste, en l'état actuel des recherches, à produire des anticorps anti-GPVI inhibiteurs. Plusieurs Moab anti-GPVI ont été décrits mais peu sont inhibiteurs. C'est le cas de JAQ1 qui est dirigé contre la GPVI de souris. L'injection de cet anticorps assure une protection durable contre les thromboses (Nieswandt *et al.*, 2001). L'effet antithrombotique de JAQ1 s'exerce en deux phases : une phase initiale transitoire pendant laquelle sont observées une diminution du nombre plaquettaire, une augmentation du temps de saignement, une réduction des réponses plaquettaires aux faibles doses de thrombine et une inhibition totale des réponses induites par le collagène (J1 à J3); la deuxième phase se caractérise par un retour à la normale de tous ces paramètres excepté l'inhibition de l'activation plaquettaire par le collagène qui persiste en raison d'un déficit total et prolongé d'expression de GPVI à la surface plaquettaire (Schulte *et al.*, 2006). La régulation négative de GPVI (> 14 jours) se prolonge bien au delà de la durée de vie des plaquettes (~ 5 jours) et peut avoir deux origines : *i*) l'internalisation du complexe GPVI-anticorps (IgG ou Fab) et *ii*) le clivage de GPVI par un mécanisme dépendant de métallo-protéases et qui affecterait aussi bien les plaquettes en circulation que les mégacaryocytes. Le clivage de GPVI pourrait être responsable du déficit en GPVI observé chez plusieurs patients en association avec un anticorps anti-GPVI (Boylan *et al.*, 2004, 2006). Ces observations renforcent l'intérêt de développer des anticorps anti-GPVI. Cependant, il n'y a pas de réaction croisée entre JAQ1 et les plaquettes humaines.

Des scFv anti-GPVI ont également été décrits mais sont de faible affinité. L'un est dirigé contre un site de liaison du collagène sur GPVI et serait actuellement l'objet de manipulations géniques afin d'augmenter son affinité (Siljander *et al.*, 2004).

Notre équipe a caractérisé plusieurs Moab anti-GPVI humaine obtenus par immunisation génique. Parmi ceux-ci l'un d'entre eux, 9O12.2 a été sélectionné sur sa capacité à inhiber l'interaction de GPVI avec le collagène fibrillaire (Lecut *et al.*, 2003). Les IgG et F(ab')<sub>2</sub> activent les plaquettes par cross-linking de GPVI entre elles et avec Fc $\gamma$ RIIA ce qui confirme l'absolue nécessité de produire des fragments monovalents d'anticorps. Effec-

tivement le Fab inhibe totalement l'activation des plaquettes par le collagène *in vitro*, la formation de *thrombi* dans des modèles en flux et en sang total, et réduit l'activité procoagulante des plaquettes (Lecut *et al.*, 2004, 2005). L'anticorps 9O12.2 ne présente pas de réaction croisée avec les plaquettes des petits animaux couramment utilisés pour les modèles de thrombose ce qui nécessite son étude chez le primate non humain.

L'anticorps 9O12 possède des propriétés intéressantes pour le développement d'un fragment thérapeutique, nous avons donc entrepris de le modifier pour réduire son immunogénicité. Les domaines variables de l'IgG ont été clonés. Un fragment simple chaîne recombinant (scFv murin) constitué des domaines VL et VH associés *via* un lien peptidique a été produit dans *E. coli* et purifié par chromatographie d'affinité sur GPVI-sepharose. Le scFv murin 9O12.2 ainsi obtenu se lie à la GPVI recombinante soluble. Son affinité déterminée par résonance plasmonique de surface est similaire à celles de l'IgG parente et du fragment Fab et à la dose demi-saturante dans un test en phase solide. Le scFv et l'IgG entrent en compétition pour la liaison à GPVI. De plus le scFv se lie à la GPVI plaquettaire comme l'indiquent les expériences de cytométrie en flux. Le scFv inhibe comme le Fab l'agrégation des plaquettes induite par le collagène.

Les séquences des domaines VH et VL ont été déterminées et alignées sur celles d'anticorps dont la séquence est proche et dont la structure a été résolue par cristallographie. Un modèle de la structure tridimensionnelle du scFv a été construit et les régions hyper variables (CDR) et les régions charpentes (FR) ont été identifiées. Une analyse structurale comparative des domaines variables a permis de concevoir la séquence d'un scFv humanisé par greffe des CDR de 9O12.2 sur les FR d'une Ig humaine en respectant la présentation correcte des boucles hyper-variables. Le scFv humanisé produit dans *E. coli* se lie à la GPVI humaine recombinante avec une affinité comparable à celle du scFv murin et à la GPVI plaquettaire.

L'épitope de 9O12.2 n'est pas identifié. Les expériences de mutation ponctuelle et la construction de protéines chimériques dans lesquelles les domaines "Ig-like" de GPVI ont été successivement remplacés par leur homologue de Fc $\alpha$ RI avec lesquels ils partagent jusqu'à 40 % d'identité suggèrent que des résidus de la deuxième boucle Ig sont importants pour la liaison de 9O12.2 (Dumont *et al.*, 2006). Des études supplémentaires combinant une validation par mutagenèse des modèles informatiques sont en cours pour identifier les résidus de GPVI impliqués dans la liaison de l'anticorps.

Un autre groupe a récemment obtenu des anticorps monoclonaux anti-GPVI humaine par immunisation de souris déficientes en GPVI. Les Fab des ces Moab ont une bonne affinité pour la GPVI et leur injection au singe *Cynomolgus* inhibe l'activation des plaquettes par le collagène *ex vivo* (Matsumoto *et al.*, 2006 ; Matsumoto *et al.*, 2006). Ces anticorps sont également proposés comme base pour le développement de nouveaux agents antithrombotiques.

Outre les récepteurs responsables de l'adhérence et de l'activation des plaquettes, d'autres glycoprotéines de la membrane plaquettaire sont impliquées dans les propriétés pro-inflammatoires des plaquettes activées. Ces molécules constituent également des cibles potentielles pour le développement d'anticorps thérapeutiques.

## LA COAGULATION CIBLE D'ANTICORPS THÉRAPEUTIQUES ?

La coagulation est initiée par l'exposition du facteur tissulaire au niveau de la lésion de la paroi vasculaire. L'activation en cascade de zymogènes plasmatiques en protéases à sérine se déroule à l'interface avec une surface procoagulante riche en phosphatidylsérine. La thrombine est l'enzyme clé produite à l'issue de la cascade. Elle clive le fibrinogène plasmatique soluble ce qui induit la polymérisation d'un réseau de fibrine insoluble. Elle régule sa propre formation positivement *via* l'activation de cofacteurs et l'activation des plaquettes et négativement *via* sa liaison à une protéine membranaire endothéliale, la thrombomoduline. Elle régule également la lyse du caillot en activant un inhibiteur de la fibrinolyse (TAFI).

Peu d'anticorps monoclonaux anticoagulants sont décrits pour avoir un effet antithrombotique. Un anticorps humanisé anti-FIXa (SB249417) a été testé dans des modèles de thrombose de la carotide chez le rat. Une efficacité sur la reperfusion supérieure à celle d'une héparine de bas poids moléculaire a été observée (Toomey *et al.*, 2000, US patent application files 2005/0146511 antithrombotic agents).

Par ailleurs, des inhibiteurs de l'activation du TAFI ou de son activité pourraient avoir des effets antithrombotiques en favorisant la fibrinolyse. Des Moab anti-TAFI humain inhibiteurs ont été produits mais non encore testés dans des modèles animaux (Gil *et al.*, 2005). Ils sont proposés comme base pour développer des agents pharmacologiques.

Le développement d'anticorps thérapeutiques anticoagulants peut donc être envisagée. Cependant les anticoagulants disponibles actuellement ont un très bon rapport coût/efficacité. Une stratégie de développement d'anticorps dirigés contre des cibles situées à l'intersection entre la coagulation et l'inflammation par exemple permettrait de cibler des pathologies dans lesquelles le traitement anticoagulant est insuffisant.

En conclusion, la recherche de nouvelles molécules antithrombotiques reste d'actualité. Le développement d'anticorps recombinants en thérapie antithrombotique apparaît être une approche en expansion et complémentaire des autres approches en particulier de la recherche de petites molécules non peptidiques actives par voie orale. Les stratégies thérapeutiques antithrombotiques se dirigent vers des associations de molécules modulables en fonction de la situation clinique. De plus amples études sont nécessaires pour préciser l'intérêt de nouveaux anticorps dans ces associations.



**Remerciements.** – Julien MUZARD a reçu une bourse de thèse GEHT/Diagnostica STAGO et de la Fondation pour la Recherche Médicale. Ce travail a bénéficié d'un soutien de la Fondation de France 2004004727.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bennett J. S., Structure & function of the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 3363-3369.
- Berlanga O., Tulasne D., Bori T., Snell D.C., Miura Y., Jung S., Moroi M., Frampton J. & Watson S. P., The Fc receptor  $\gamma$ -chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, 2951-2960.
- Boylan B., Berndt M. C., Kahn M. L. & Newman P. J., Activation-independent, antibody-mediated removal of GPVI from circulating human platelets: development of a novel NOD/SCID mouse model to evaluate the *in vivo* effectiveness of anti-human platelet agents. *Blood*, 2006, 108, 908-914.
- Boylan B., Chen H., Rathore V., Paddock C., Salacz M., Friedman K. D., Curtis B. R., Stapleton M., Newman D. K., Kahn M. L. & Newman P. J., Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/Fc $\gamma$ -chain complex from the human platelet surface. *Blood*, 2004, 104, 1350-1355.
- Cadroy Y., Hanson S. R., Kelly A. B., Marzec U. M., Evatt B. L., Kunicki T. J., Montgomery R. R. & Harker L. A., Relative antithrombotic effects of monoclonal antibodies targeting different platelet glycoprotein-adhesive molecule interactions in nonhuman primates. *Blood*, 1994, 83, 3218-3224.
- Cauwenberghs N., Meiring M., Vauterin S., van Wyk V., Lamprecht S., Roodt J. P., Novak L., Harsfalvi J., Deckmyn H. & Kotze H. F., Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in non-human primates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, 20, 1347-1353.
- Cauwenberghs N., Vanhoorelbeke K., Vauterin S. & Deckmyn H., Structural determinants within platelet glycoprotein Ib $\alpha$  involved in its binding to von Willebrand factor. *Platelets*, 2000, 11, 373-378.
- Cauwenberghs N., Vanhoorelbeke K., Vauterin S., Westra D. F., Romo G., Huizinga E. G., Lopez J. A., Berndt M. C., Harsfalvi J. & Deckmyn H., Epitope mapping of inhibitory antibodies against platelet glycoprotein Ib $\alpha$  reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein Ib $\alpha$ . *Blood*, 2001, 98, 652-660.
- Christopoulos C. G., Thrombocytopenia following treatment with platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Blood*, 2003, 101, 1655; author reply 1655.
- Clemetson J. M., Polgar J., Magnenat E., Wells T. N. & Clemetson K. J., The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc $\alpha$ R and the natural killer receptors. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 29019-29024.
- Coller B. S., Folts J. D., Scudder L. E. & Smith S. R., Antithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in an experimental animal model. *Blood*, 1986, 68, 783-786.
- Coller B. S., Folts J. D., Smith S. R., Scudder L. E. & Jordan R., Abolition of *in vivo* platelet thrombus formation in primates with monoclonal antibodies to the platelet GPIIb/IIIa receptor. Correlation with bleeding time, platelet aggregation, and blockade of GPIIb/IIIa receptors. *Circulation*, 1989, 80, 1766-1774.
- Coller B. S., Peerschke E. I., Scudder L. E. & Sullivan C. A., A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J. Clin. Invest.*, 1983, 72, 325-338.
- Cosemans J. M., Kuijpers M. J., Lecut C., Loubele S. T., Heene-man S., Jandrot-Perrus M. & Heemskerk J. W., Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 2005, 181, 19-27.
- Curtis B. R., Swyers J., Divgi A., McFarland J. G. & Aster R. H., Thrombocytopenia after second exposure to abciximab is caused by antibodies that recognize abciximab-coated platelets. *Blood*, 2002, 99, 2054-2059.
- De Luca G., Suryapranata H., Stone G. W., Antoniucci D., Tchong J. E., Neumann F. J., Van de Werf F., Antman E. M. & Topol E. J., Abciximab as adjunctive therapy to reperfusion in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*, 2005, 293, 1759-1765.
- Dumont B., Minullina I., Loyau S., Monteiro R. C., Lacapere J. J., Arocas V. & Jandrot-Perrus M., Chimeric Fc Receptors identify ligand binding regions in human glycoprotein VI. *J. Mol. Biol.*, 2006, 361, 877-887.
- Fontayne A., Vanhoorelbeke K., Pareyn I., Van Rompaey I., Meiring M., Lamprecht S., Roodt J., Desmet J. & Deckmyn H., Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIIb $\alpha$  antibody: 6B4. *Thromb. Haemost.*, 2006, 96, 671-684.
- Gils A., Ceresa E., Macovei A. M., Marx P. F., Peeters M., Compennolle G. & Declercq P. J., Modulation of TAFI function through different pathways – implications for the development of TAFI inhibitors. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3, 2745-2753.
- Gold H. K., Coller B. S., Yasuda T., Saito T., Fallon J. T., Guerrero J. L., Leinbach R. C., Ziskind A. A. & Collen D., Rapid and sustained coronary artery recanalization with combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and monoclonal antiplatelet GPIIb/IIIa antibody in a canine preparation. *Circulation*, 1988, 77, 670-677.
- Gruner S., Prostedna M., Koch M., Miura Y., Schulte V., Jung S. M., Moroi M. & Nieswandt B., Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood*, 2005, 105, 1492-1499.
- Hanson S. R., Pareti F. I., Ruggeri Z. M., Marzec U. M., Kunicki T. J., Montgomery R. R., Zimmerman T. S. & Harker L. A., Effects of monoclonal antibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex on thrombosis and hemostasis in the baboon. *J. Clin. Invest.*, 1988, 81, 149-158.
- Harder S., Kirchmaier C. M., Krzywanek H. J., Westrup D., Bae J. W. & Breddin H. K., Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of a new antibody glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (YM337) in healthy subjects. *Circulation*, 1999, 100, 1175-1181.
- Hodivala-Dilke K. M., McHugh K. P., Tsakiris D. A., Rayburn H., Crowley D., Ullman-Cullere M., Ross F. P., Coller B. S., Teitelbaum S. & Hynes R. O.,  $\beta$ 3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.*, 1999, 103, 229-238.
- Holtkotter O., Nieswandt B., Smyth N., Muller W., Hafner M., Schulte V., Krieg T. & Eckes B., Integrin  $\alpha$ 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 10789-10794.
- Hoylaerts M. F., Yamamoto H., Nuyts K., Vreys I., Deckmyn H. & Vermynen J., von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem. J.*, 1997, 324 (Pt 1), 185-191.
- Hughes D. L., Stafford P., Hamaia S. W., Harmer J., Schoolmeester A., Deckmyn H., Farndale R. W., Ouwehand W. H.

- & Watkins N. A., Platelet integrin  $\alpha 2$  I-domain specific antibodies produced *via* domain specific DNA vaccination combined with variable gene phage display. *Thromb. Haemost.*, 2005, 94, 1318-1326.
- Jandrot-Perrus M., Busfield S., Lagrue A. H., Xiong X., Debili N., Chickering T., Le Couedic J. P., Goodearl A., Dussault B., Fraser C., Vainchenker W. & Villevall J. L., Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*, 2000, 96, 1798-1807.
- Kageyama S., Matsushita J. & Yamamoto H., Effect of a humanized monoclonal antibody to von Willebrand factor in a canine model of coronary arterial thrombosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 443, 143-149.
- Kageyama S., Yamamoto H., Nagano M., Arisaka H., Kayahara T. & Yoshimoto R., Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand factor. *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 122, 165-171.
- Kam P. C. & Egan M. K., Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: pharmacology and clinical developments. *Anesthesiology* 2002, 96, 1237-1249.
- Kastrati A., Mehilli J., Neumann F. J., Dotzer F., ten Berg J., Bollwein H., Graf I., Ibrahim M., Pache J., Seyfarth M., Schühlen H., Dirschinger J., Berger P. B. & Schomig A., Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR-REACT 2 randomized trial. *JAMA*, 2006, 295, 1531-1538.
- Kato K., Kanaji T., Russell S., Kunicki T. J., Furihata K., Kanaji S., Marchese P., Reininger A., Ruggeri Z.M. & Ware J., The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*, 2003, 102, 1701-1707.
- Konishi H., Katoh Y., Takaya N., Kashiwakura Y., Itoh S., Ra C. & Daida H., Platelets activated by collagen through immunoreceptor tyrosine-based activation motif play pivotal role in initiation and generation of neointimal hyperplasia after vascular injury. *Circulation*, 2002, 105, 912-916.
- Konstantinides S., Ware J., Marchese P., Almus-Jacobs F., Loskutoff D. J. & Ruggeri Z. M., Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein I $\text{b}\alpha$  and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, 4, 2014-2021.
- Krupski W. C., Bass A., Kelly A. B., Ruggeri Z. M., Harker L. A. & Hanson S. R., Interruption of vascular thrombosis by bolus anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa monoclonal antibodies in baboons. *J. Vasc. Surg.*, 1993, 17, 294-303; discussion 303-304.
- Lagrue-Lak-Hal A. H., Debili N., Kingsbury G., Lecut C., Le Couedic J. P., Villevall J. L., Jandrot-Perrus M. & Vainchenker W., Expression and function of the collagen receptor GPVI during megakaryocyte maturation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 15316-15325.
- Lecut C., Feeney L. A., Kingsbury G., Hopkins J., Lanza F., Gachet C., Villevall J. L. & Jandrot-Perrus M., Human platelet glycoprotein VI function is antagonized by monoclonal antibody-derived Fab fragments. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1, 2653-2662.
- Lecut C., Feijge M. A., Cosemans J. M., Jandrot-Perrus M. & Heemskerk J. W., Fibrillar type I collagens enhance platelet-dependent thrombin generation *via* glycoprotein VI with direct support of  $\alpha 2\beta 1$  but not  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  integrin. *Thromb. Haemost.*, 2005, 94, 107-114.
- Lecut C., Schoolmeester A., Kuijpers M.J., Broers J.L., van Zandvoort M. A., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H., Jandrot-Perrus M. & Heemskerk J. W., Principal role of glycoprotein VI in  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, 24, 1727-1733.
- Lopez J. A., Andrews R. K., Afshar-Kharghan V. & Berndt M. C., Bernard-Soulier syndrome. *Blood*, 1998, 91, 4397-4418.
- Mangin P., Yap C. L., Nonne C., Sturgeon S. A., Goncalves I., Yuan Y., Schoenwaelder S. M., Wright C. E., Lanza F. & Jackson S. P., Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/Fc $\gamma$  deficiency. *Blood*, 2006, 107, 4346-4353.
- Massberg S., Konrad I., Bultmann A., Schulz C., Munch G., Peluso M., Lorenz M., Schneider S., Besta F., Muller I., Hu B., Langer H., Kremmer E., Rudelius M., Heinzmann U., Ungerer M. & Gawaz M., Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall *in vivo*. *FASEB J.* 2004, 18, 397-399.
- Matsumoto Y., Takizawa H., Gong X., Le S., Lockyer S., Okuyama K., Tanaka M., Yoshitake M., Tandon N.N. & Kambayashi J., Highly potent anti-human GPVI monoclonal antibodies derived from GPVI knockout mouse immunization. *Thromb. Res.*, 2006, 119, 319-329.
- Matsumoto Y., Takizawa H., Nakama K., Gong X., Yamada Y., Tandon N. N. & Kambayashi J., *Ex vivo* evaluation of anti-GPVI antibody in cynomolgus monkeys: dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thromb. Haemost.*, 2006, 96, 167-175.
- Mazurov A. V., Pevzner D. V., Antonova O. A., Byzova T. V., Khaspekova S. G., Semenov A. V., Vlasik T. N., Samko A. N., Staroverov I. I. & Ruda M. Y., Safety, inhibition of platelet aggregation and pharmacokinetics of Fab'2 fragments of the anti-glycoprotein IIb-IIIa monoclonal antibody FRaMon in high-risk coronary angioplasty. *Platelets*, 2002, 13, 465-477.
- Nieswandt B., Schulte V., Bergmeier W., Mokhtari-Nejad R., Rackebandt K., Cazenave J. P., Ohlmann P., Gachet C. & Zimigibl H., Long-term antithrombotic protection by *in vivo* depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J. Exp. Med.*, 2001, 193, 459-469.
- Nurden A. T., Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2006, 1, 10.
- Penz S., Reininger A. J., Brandl R., Goyal P., Rabie T., Bernlochner I., Rother E., Goetz C., Engelmann B., Smethurst P. A., Ouweland W. H., Farndale R., Nieswandt B. & Siess W., Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J.*, 2005, 19, 898-909.
- Ribba A. S., Loisel I., Lavergne J. M., Juhan-Vague I., Obert B., Chel G., Meyer D. & Girma J. P., Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb. Haemost.*, 2001, 86, 848-854.
- Ruggeri Z. M., Pathogenesis and classification of von Willebrand disease. *Haemostasis*, 1994, 24, 265-275.
- Santoro S. A., Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell*, 1986, 46, 913-920.
- Schulte V., Reusch H. P., Pozgajova M., Varga-Szabo D., Gachet C. & Nieswandt B., Two-phase antithrombotic protection after anti-glycoprotein VI treatment in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26, 1640-1647.
- Siljander P. R., Munnix I. C., Smethurst P. A., Deckmyn H., Lindhout T., Ouweland W. H., Farndale R. W. & Heemskerk J. W., Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood*, 2004, 103, 1333-1341.
- Smyth S. S., Reis E. D., Vaananen H., Zhang W. & Collier B. S., Variable protection of  $\beta 3$ -integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood*, 2001, 98, 1055-1062.
- Staelens S., Desmet J., Ngo T.H., Vauterin S., Pareyn I., Barbeaux P., Van Rompaey I., Stassen J. M., Deckmyn H. & Vanhoorelbeke K., Humanization by variable domain resurfacing and

- grafting on a human IgG4, using a new approach for determination of non-human like surface accessible framework residues based on homology modelling of variable domains. *Mol. Immunol.*, 2006, 43, 1243-1257.
- Sugiyama T., Okuma M., Ushikubi F., Sensaki S., Kanaji K. & Uchino H., A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1987, 69, 1712-1720.
- Takaya N., Katoh Y., Iwabuchi K., Hayashi I., Konishi H., Itoh S., Okumura K., Ra C., Nagaoka I. & Daida H., Platelets activated by collagen through the immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the Fc receptor  $\gamma$ -chain play a pivotal role in the development of myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2005, 39, 856-864.
- Tcheng J. E., Ellis S. G., George B. S., Kereiakes D. J., Kleiman N. S., Talley J. D., Wang A. L., Weisman H. F., Califf R. M. & Topol E. J., Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation*, 1994, 90, 1757-1764.
- Toomey J. R., Blackburn M. N., Storer B. L., Valocik R. E., Koster P. F. & Feuerstein G. Z., Comparing the antithrombotic efficacy of a humanized anti-factor IX(a) monoclonal antibody (SB 249417) to the low molecular weight heparin enoxaparin in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb. Res.*, 2000, 100, 73-79.
- Wu D., Meiring M., Kotze H. F., Deckmyn H. & Cauwenberghs N., Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, 22, 323-328.
-