



(12) PATENT

(19) NO

(11) 337265

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)
A61M 31/00 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20053774	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.01.09 PCT/BE2004/000002
(22)	Inng.dag	2005.08.08	(85)	Videreføringssdag	2005.08.08
(24)	Løpedag	2004.01.09	(30)	Prioritet	2003.01.10, EP, 03447005 2003.06.23, WO, PCT/EP2003/06581 2003.07.08, WO, PCT/EP2003/07313 2003.11.07, WO, PCT/BE2003/00189 2003.11.07, WO, PCT/BE2003/00190 2003.11.07, WO, PCT/BE2003/00192 2003.11.07, WO, PCT/BE2003/00193 2003.11.07, WO, PCT/BE2003/00194 2003.12.01, WO, PCT/BE2003/00206 2003.12.02, WO, PCT/BE2003/00191
(41)	Alm.tilgj	2005.08.31			
(45)	Meddelt	2016.02.29			
(73)	Innehaver	Abylynx NV, Technologiepark 4, bus 7, BE-9052 ZWIJNAARDE, Belgia			
(72)	Oppfinner	Karen Silence, Jean Tombeurstraat 21, BE-3090 OVERIJSE, Belgia			
(74)	Fullmektig	Protector Intellectual Property Consultants AS, Oscarsgate 20, 0352 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Et polypeptidkonstrukt rettet mot von Willebrand faktor, anvendelse av polypeptidkonstruktet, sammensetninger omfattende polypeptidkonstruktet, og fremgangsmåte for dets fremstilling.			
(56)	Anførte publikasjoner	US 2002028204 A1 US 6251393 B1 GHAHROUDI ARBABI M. ET AL., "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", FEBS Letters, vol. 414, no. 3, 1997, pages 521-526 MUYLDERMANS SERGE, "Single domain camel antibodies: current status; Reviews in Molecular Biotechnology, vol. 74, no. 4, 2001, pages 277-302			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår polypeptider omfattende minst ett enkeltomene antistoff rettet mot vWF, vWF AI domene, AI domene av aktivert vWF, vWF A3 domene, gpIb og/eller kollagen, homologer av nevnte polypeptider, og/eller funksjonelle deler av nevnte polypeptider, for behandlingen av betingelser som krever en modulering av blodplate-mediert aggregering og som overviner problemene ifølge kjent teknikk. Et videre aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er fremgangsmåter for produksjon av nevnte polypeptider, fremgangsmåter for å belegge anordninger med slike polypeptider benyttet i medisinske prosedyrer (f.eks. PCTA, stenting), fremgangsmåter og sett for skrening for midler som modulerer blodplate-mediert aggregering og sett for diagnostisering av sykdommer relatert til blodplate-mediert aggregering.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

- Etter skade på blodkar, blir subendoteliale strukturer eksponert som medierer blodplateadhesjon gjennom samvirking med von Willebrand faktoren (vWF). vWF danner en bro mellom collagen i den skadede karveggen og blodplatereseptoren glykoprotein Ib(gplb), en samvirking som er spesielt viktig under høy-skjær betingelser, fører til dannelsen av en homeostatisk plugg og forhindring således overdreven blødning (Bennett S, Thromb Haemost (2001) Mar; 85 (3): 395-400). Under normal homeostases, fører disse prosessene til sårheling av den skadede blodkarveggen. Under patologiske betingelser, kan imidlertid overdreven blodplatefunksjon føre til trombusdannelse. vWF subenheten er sammensatt av flere homologe domener som hver dekker forskjellige funksjoner. vWF samvirker gjennom dets A3 domene med fibrillære collagenfibere og gjennom dets A1 domene med blodplatereseptoren gplb. Under normal betingelser samvirker ikke blodplater og vWF. Imidlertid, når vWF er bundet til collagen ved høy skjærrate, er det antatt å gjennomgå konformasjonsendring som tillater dets binding med blodplatereseptoren gplb. Denne reversible adhesjonen tillater blodplater å rulle over det skadede arealet, noe som så blir fulgt av en sterk adhesjon via collagenreseptorene på blodplatene (gplb/IIa, gpVI, gpIV, p65, TIIICBP) resulterende i blodplateaktivering. Dette fører til aktivering av gpttb/ttta reseptoren, fibrinogenbindingen, og til sist til blodplateaggregeringen.
- Blodplateaggregeringsinhibitorer har blitt isolert fra blodsugende organismer, slik som igler. Saratin, avledet fra iglen *Hirudo medicinalis* er beskrevet i WO 02/15919 A2 og in Cruz CP et al referansen, Saratin, an inhibitor of von Willebrand factor-dependent platelet adhesion, decreases platelet aggregation and intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model. *Journal of Vascular Surgery*, 2001,34 : 724-729 og i Smith TP et.al, Saratin, an inhibitor of collagen-platelet interaction, decreases venous anastomotic intimal hyperplasia in a canine dialysis access model, *Vasc Endovascular Surg* : 2003 Jul-Aug ; 37 (4): 259-69.
- Antistoff-baserte terapeutika har blitt utviklet, noen av hvilke i dag blir benyttet i terapi.
- Abciximab (Kimerisk 7E3 Fab; ReoPro; US 6,071, 514, EP 0 882 453), Fab fragmentet av det mus humane kimæriske antistoffet 7E3 som inhiberer ligandbinding til blodplate gpIb/IIIa reseptoren, ble godkjent for human anvendelse som tilleggsterapi for å forhindre iskemiske komplikasjoner ved perkutane koronare intervensjoner i desember 1994. Det viktigste sikkerhetsaspektet ved gpIb/IIIa-inhibitorer er risikoen for

blødning, da den kraftige anti-blodplateeffekten til disse medikamentene negativt kan påvirke homeostases.

Et murint monoklonalt antistoff ble utviklet mot vWF A1 domenet (US2002/0028204 A1
5 ; US 6,280, 731 og i WO 00/10601) og mot dets aktive konformasjon (US 6,251, 393).
In vivo effektiviteten er beskrevet i Kageyama S, et al : "Effect of a humanized
monoklonal antibody to von Willebrand factor in a canine model of coronary arterial
thrombosis", Eur J Pharmacol. 2002 May 17 ; 443 (1-3): 143-9, og i "Anti-human vWF
10 monoclonal antibody, AJvW-2 Fab, inhibits repetitive coronary artery trombosis without
bleeding time prolongation in dogs". Thromb Res., 2001 Mar 1; 101 (5): 395-404. "Anti-
human von Willebrand factor monoklonal antibody AJvW-2 prevents thrombus
deposition and neointima formation after balloon injury in guineapigs". Arterioscler
Thromb Vasc Biol. 2000 Oct; 20 (10): 2303-8). AJvW-2 inhiberte høyskjærstress-
indusert aggregering av humane blodplater og hadde ingen effekt på lavskjærstress-
15 indusert blodplateaggregering.

Effektene i bavian på et murint antistoff 82D6A3 rettet mot A3 domenet av human vWF,
er beskrevet i WO 02/051351, og Dongmei Wu et al, "Inhibition of the von Willebrand
(VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in
20 abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons". Hemostasis,
trombosis andvascular biology, 2002, 99: 3623-3628.

Antistoff 6B4 er et monoklonalt antistoff (MoAb) rettet mot rensset humant gpIb. MoAb
6B4 inhiberer både ristocetin-og botrocetin-indusert, vWF-avhengig human
25 blodplateagglutinerings. MoAb 6B4 blokkerer videre skjær-indusert adhesjon av humane
blodplater til collagen I. Når injisert i bavianer, forårsaket intakt IgG og dets F (ab') (2)
fragmenter nesten umiddelbar trombocytopenia, på grunn av bivalensen til F (ab') (2)
som medierer blodplattetverbinding, eller Fc: Fc reseptor-samvirkninger som medierer
aktivering av blodplateaggregering (WO 0110911; Cauwenberghs N. et.al.,
30 Arteriosclerosis, Trombosis og Vascular biology, 2000,20 : 1347 og se, for eksempel,
Cadroy Y et al, Blood, 1994,83 : 3218-3224, Becker BH et al, Blood, 1989,74 : 690-
694, Ravanat C. et al, Thromb. Haemost. 1999,82: 528a sammendrag).
Blodplateavsetning på collagen-rik bovint pericardium ble inhibert når Fab fragmenter
ble injisert inn i bavianene før en blodpropp ble generert. Imidlertid, når Fab
35 fragmentene ble injisert etter at en blodpropp ble tillatt å danne seg, ble ingen

inhibering av ytterligere trombose observert. Utbyttet av ekspresjon av nevnte Fab molekyler er meget lav og fremgangsmåten for fremstilling er meget arbeidsintensiv.

MÅLENE FOR FORELIGGENDE OPPFINNELSE

- 5 Et mål for foreliggende oppfinnelse er å fremskaffe polypeptider omfattende et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot vWF, vWF A1 domene, A1 domene av aktivert vWF, vWF A3 domene, gplb og/eller collagen, homologer av nevnte polypeptider, og/eller funksjonelle deler av nevnte polypeptider, for behandlingen for betingelser som krever en modulering av blodplate-mediert aggregering og som overviner problemene
- 10 ifølge kjent teknikk. Det er et ytterligere mål å fremskaffe fremgangsmåter for produksjon av nevnte polypeptider, fremgangsmåter for å belegge anordninger med slike polypeptider benyttet i medisinske prosedyrer (f.eks. PCTA, stenting), fremgangsmåter og sett for screening for midler som modulerer blodplate-mediert aggregering og sett for diagnosen av sykdommer relatert til blodplate-mediert
- 15 aggregering

OPPSUMMERING IFØLGE FORELIGGENDE OPPFINNELSE

- Det er blitt fremstilt enkeltdomene antistoffer som spesifikt gjenkjenner målmolekyler som er involvert i det første og påfølgende trinn av blodplateaggregeringen. Dette
- 20 resulter i antitrombotiske midler som er mer effektive og sikrere.

- Ifølge et første aspekt angår foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt bestående av ett eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot von Willebrand Faktor (vWF) og eventuelt en peptidlinker, hvor enkeltdomene antistoffet eller antistoffene er
- 25 valgt blant gruppen enkeltdomene antistoffer bestående av sekvensen representert ved en hvilken som helst av SEQ ID nr: 1 til 3, 5 eller 7, eller en homolog sekvens av en hvilken som helst av SEQ ID nr. 3, 5 eller 7 med en sekvensidentitet på mer enn 70% med den opphavelige sekvensen; og hvor nevnte homologe sekvens er i stand til
- 30 å hemme minst 50% blodplateaggregering ved en skjærrate på 1600 s^{-1} ved en konsentrasjon mellom 0,08 og 0,3 $\mu\text{g/ml}$.

Spesifikke utførelsesformer av dette første aspektet er angitt i kravene 2 til 16.

Ifølge et andre aspekt angår foreliggende oppfinnelse en sammensetning omfattende et polypeptidkonstrukt som ifølge det første aspektet, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

- 5 Spesifikke utførelsesformer av dette andre aspektet er angitt i kravene 18 til 20.

Ifølge et tredje aspekt angår foreliggende oppfinnelse en nukleinsyre som koder for et polypeptidkonstrukt ifølge det første aspektet.

- 10 Ifølge et fjerde aspekt angår foreliggende oppfinnelse et polypeptidkonstrukt ifølge det første aspektet for anvendelse i behandlingen, forhindring og/eller lettelse av forstyrrelser relatert til blodplate-medierer aggregering eller dysfunksjon derav.

Spesifikke utførelsesformer av dette fjerde aspektet er angitt i kravene 23 til 26.

15

Ifølge et femte aspekt angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptidkonstrukt ifølge det første aspektet, omfattende:

- (a) dyrking av vertsceller omfattende nukleinsyrer som koder for et polypeptid ifølge det første aspektet, under betingelser som tillater ekspresjonen av polypeptidet, og,
20 (b) gjenvinning av det produserte polypeptidet fra kulturen.

En spesifikk utførelsesform av dette femte aspektet er angitt i krav 28.

- 25 Ifølge et sjette aspekt angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for diagnostisering av en sykdom eller forstyrrelser karakterisert ved dysfunksjon av blodplatediert aggregering omfattende trinnene:

- (a) bringe i kontakt en prøve med et polypeptidkonstrukt ifølge det første aspektet, og
(b) detektering av binding av nevnte polypeptidkonstrukt til nevnte prøve, og
30 (c) sammenligning av bindingen detektert i trinn (b) med en standard, hvor en forskjell i binding relativt til nevnte prøve er diagnostisk for en sykdom eller forstyrrelser karakterisert ved dysfunksjon av blodplate-mediert aggregering.

35

DETALJERT BESKRIVELSE

Foreliggende oppfinnelse angår et polypeptidkonstrukt ifølge krav 1 og funnet at konstruktet har en modulerende effekt på blodplate-mediert aggregering.

5 Mål

Ifølge foreliggende oppfinnelse, er et mål et hvilket som helst av vWF, vWF A1 domenet, A1 domenet av aktivert vWF eller vWF A3 domene. Nevnte mål er pattedyr, og er avledet fra arter slik som kanin, geit, mus, rotte, ku, kalv, kameler, lamaer, aper, esel, marsvin, kyllinger, sauer, hunder, katter, hester, og fortrinnsvis mennesker.

10 Sekvensen til humant vWF er gitt i Tabell 30, SEQ ID nr: 48.

Et mål er også et fragment av vWF, vWF A1 domenet, A1 domenet av aktivert vWF eller vWF A3 domenet, som er i stand til å fremkalle en immunrespons. Et mål er også et fragment av vWF, vWF A1 domenet, A1 domenet av aktivert vWF eller vWF A3 domenet, som er i stand til binding til et enkeltomene antistoff rettet mot fullengde” mor”-målet.

15

Et fragment som benyttet heri angår mindre enn 100% av sekvensen (f.eks. , 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), men omfattende 5,6, 7,8, 9,10, 12,13, 14,15, 16,17, 18,19, 20,21, 22,23, 24,25 eller flere aminosyrer. Et fragment har tilstrekkelig lengde slik at den aktuelle samvirkningen blir opprettholdt med en affinitet på 1×10^{-6} M eller bedre.

20

Et fragment som benyttet heri angår også eventuelle insertsjoner, delesjoner og substitusjoner av en eller flere aminosyrer som ikke betydelig endrer muligheten til målet å binde seg til et enkeltomene antistoff rettet mot villtype målet. Antallet aminosyreinsertsjoner, -delesjoner eller -substitusjoner er foretrukket opp til 1,2, 3,4, 5,6, 7,8, 9,10, 11,12, 13, 14,15, 16,17, 18,19, 20,21, 22,23, 24,25, 26,27, 28,29, 30,31, 32,33, 34,35, 36,37, 38, 39,40, 41,42, 43,44, 45,46, 47,48, 49,50, 51,52, 53,54, 55,56, 57,58, 59,60, 61,62, 63, 64,65, 66,67, 68,69 eller 70 aminosyrer.

25

30

Et enkeltomene antistoff rettet mot et mål betyr enkeltomene antistoff som er i stand til å binde til sitt mål med en affinitet på bedre enn 10^{-6} M.

Enkeltdomene antistoffer

Enkeltdomene antistoffer er antistoffer hvis komplementære bestemmende regioner er del av et enkeltdomene polypeptid. Eksempels inkluderer, men er ikke begrenset til, tungkjede antistoffer, antistoffer naturlig fri for lette kjeder, enkeltdomene antistoffer

5 avledet fra konvensjonelle 4-kjedede antistoffer, engineerede antistoffer og enkeltdomene skjeletter som er forskjellig fra de avledet fra antistoffer. Enkeltdomene antistoffer kan være et hvilket som helst innen teknikken, eller et hvilket som helst fremtidig enkeltdomene antistoff. Enkeltdomene antistoffer kan være avledet fra hvilke som helst arter inkludert, men ikke begrenset til mus, menneske, kamel, lama, geit,

10 kanin, storfe. Ifølge et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse, er et enkeltdomene antistoff som benyttet heri et naturlig forekommende enkeltdomene antistoff kjent som tungkjede antistoff som er fri for lette kjeder. Slike enkeltdomene antistoffer er beskrevet i WO 9404678 for eksempel. Av klarhetshensyn, er dette variable domenet som er avledet fra et tungkjede antistoff naturlig manglende lett kjede, kjent heri som

15 VHH eller nanobody for å skille det fra det konvensjonelle VH av firekjedede immunoglobuliner. Et slikt VHH molekyl kan være avledet fra antistoffer opprettet i Camelidae arter, for eksempel in kamel, lama, dromedar, alpakka og guansko. Andre arter ved siden av Camelidae kan produsere tungkjede antistoffer som naturlig mangler lette kjede; slike VHHs er innen rammen ifølge foreliggende oppfinnelse.

20 VHHs, ifølge foreliggende oppfinnelse, og som kjent av fagmannen, er tungkjede variable domener avledet fra immunoglobuliner naturlig manglende lettkjeder slik som de avledet fra Camelidae som beskrevet i W09404678 (og referert til heretter som VHH domener eller nanobodies). VHH molekyler er omkring 10x mindre enn IgG molekyler.

25 De er enkle polypeptider og meget stabile, motstår ekstreme pH- og temperaturbetingelser. Videre er de resistente overfor virkningen av proteaser, noe som ikke er tilfelle for konvensjonelle antistoffer. Videre, produserer in vitro ekspresjon av VHHs høyt utbytte, av riktig foldede funksjonelle VHHs. I tillegg, vil antistoffer

30 generert i Kamelider gjenkjenne epitoper som er forskjellige fra de gjenkjent av antistoffer generert in vitro gjennom anvendelsen av antistoff biblioteker eller via immunisering av pattedyr forskjellige fra Kamelider (WO 9749805). Som sådan, kan anti-albumin VHH's samvirke på en mer effektiv måte med serumalbumin som er kjent å være et bærerprotein. Som et bærerprotein kan noen av epitopene av serumalbumin

35 være utilgjengelige av bundne proteiner, peptider og små kjemiske forbindelser. Siden

VHH's er kjent å binde til "uvanlige" eller ikkekonvensjonelle epitoper slik som kaviteter (W09749805), kan affiniteten til VHH's overfor sirkulerendealbumin være øket.

Klasser av VHH

- 5 Foreliggende oppfinnelse angår videre et polypeptidkonstrukt, hvor et enkeltomene antistoff er et VHH rettet mot et mål nevnt heri, hvor VHH hører til en klasse som har human-like sekvenser. Klassen er karakterisert ved at VHHs bærer en aminosyre fra gruppen bestående av glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, tyrosine, tryptofan, metionin, serin, treonin, asparagin, eller glutamin i posisjon 45, slik
- 10 som, for eksempel, L45 ifølge Kabat nummereringen. En VHH-sekvens representert ved SEQ ID nr: 1 og SEQID nr: 3 som binder til vWF, hører til denne human-like klassen av VHH polypeptider. Som sådan, viser peptider som hører til denne klassen en høy aminosyre sekvenshomologi med humane VH frameworkregioner og nevnte peptider kan bli direkte administrert til et menneske uten at det forventes en ønsket
- 15 immunrespons av dette, og uten byrden ved videre humanisering.

Derfor tillater et aspekt beskrevet heri direkte administrasjon av et polypeptidkonstrukt omfattende et eller flere enkeltomene antistoffer tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst av SEQ ID nr:1 og 3 til en pasient med behov for

20 dette.

En annen human-like klasse av Camelidae enkeltomene antistoffer representert ved SEQ ID No. 16 og 18 har blitt beskrevet i WO 03/035694 og inneholder de hydrofobe FR2 restene som typisk blir funnet i konvensjonelle antistoffer av human opprinnelse

25 eller fra andre arter, men kompenserer dette tapet i hydrofilisitet ved et antall rester slik som den ladde arginin resten, serin eller uladde rester slik som glycin i posisjon 103 som erstatter den konserverte tryptofanresten som er til stede i VH fra dobbelt kjede antistoffer. Som sådan, viser peptider som hører til disse to klassene en høy aminosyre sekvenshomologi med humane VH frameworkregioner og nevnte peptider kan bli

30 administrert til et menneske direkte uten forventning om uønskede immunresponser fra dette og uten byrden ved videre humanisering.

Et hvilket som helst VHHs som benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse kan være av de tradisjonelle klasser eller FRA klassene av human-like Camelidae antistoffer.

35 Nevnte antistoffer kan være rettet mot hele mål eller et fragment derav. Disse

polypeptidene inkluderer fullengde Camelidae antistoffene, nemlig Fc og VHH domenene, kimæriske versjoner av tungkjede Camelidae antistoffer med et humant Fc domene.

5 De et eller flere enkeltdomene antistoffene av polypeptidkonstruktet som er rettet mot et mål, kan ha samme sekvens. Alternativt trenger de ikke alle å ha samme sekvens. Idet er innen rammen ifølge foreliggende oppfinnelse at et polypeptidkonstrukt omfatter antimål enkeltdomene antistoffer som ikke alle deler den samme sekvens, men som er rettet mot det samme målet, eller fragment derav, et eller flere antigener derav.

10

Det er et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse at polypeptidkonstruktet omfatter to eller flere enkeltdomene antistoffer, hvor hvilke som helst to enkeltdomene antistoffer er rettet mot forskjellige mål, dvs. mot et hvilket som helst vWF, vWF A1 domene, A1 domene av aktivert vWF, vWF A3 domene, gplb og collagen.

15

Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er et bi-spesifikt polypeptidkonstrukt omfattende et enkeltdomene antistoff rettet mot vWF A1 domene, A1 domene av aktivert vWF, og et annet enkeltdomene antistoff rettet mot vWF A3 domene. Nevnte bi-spesifikke polypeptidkonstrukt inhiberer samvirkningen mellom vWF og collagen, og samvirkningen mellom vWF og blodplater.

20

Ifølge et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse kan et polypeptidkonstrukt omfatte to eller flere enkeltdomene antistoffer som er blitt forenet. Enkeltdomene antistoffene kan ha identisk sekvens og være rettet mot det samme målet eller antigenet. Avhengig av antallet linkede VHHs, kan et multivalent VHH være bivalent (2VHHs), trivalent (3VHHs), tetravalent (4 VHHs) eller ha en høyere valens molekylar.

25

Foreliggende oppfinnelse angår også funnet at et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri videre omfattende et eller flere enkeltdomene antistoffer hver rettet mot et serum protein fra et individ, overraskende har en signifikant forlenget halveringstid i sirkulasjon i nevnte individ sammenlignet med halveringstiden til anti-mål enkeltdomene antistoff(ene) når de ikke er del av nevnte konstrukt. Videre, ble nevnte konstrukter funnet å vise de samme fordelaktige egenskapene til VHHs slik at høy stabilitet forblir intakt i mus, ekstrem pH-resistens, høy temperaturstabilitet og høy

30

måaffinitet.

Eksempler på slike konstrukter er representert ved SEQID Nr. 13 til 15, som omfatter anti-vWF VHH og anti-mus serumalbumin VHH.

5

Derfor er en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse et polypeptid-konstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved et hvilket som helst SEQ ID nr: 13 til 15.

10 Andre eksempler på slike konstrukter er representert ved SEQ ID No. 42 til 45, som omfatter humaniserte anti-vWF VHH og anti-mus serumalbumin VHH.

Derfor er en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse et polypeptid-konstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved et hvilket som helst SEQ ID nr: 42

15 til 45.

Serumproteinet kan være et hvilket om helst passende protein funnet i individets serum, eller fragment derav. Ifølge ett aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse, er serum protein serumalbumin, serum immunoglobuliner, tyroxin-bindende protein, transferrin, eller fibrinogen. Avhengig av den tiltenkte anvendelsen slik som den nødvendige halveringstiden for effektiv behandling og/eller kompartmentalisering av målantigenet, kan VHH-partneren være rettet mot ett av de ovenfor nevnte serum proteinene.

20

Eksempler på enkeltdomene antistoffer rettet mot serum albumin er sekvensene representert ved sekvensene tilsvarende til en hvilken som helst SEQID nr: 16 til 19 og 49 til 61.

25

Derfor er et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse et polypeptidkonstrukt som videre omfatter et eller flere anti-serum enkeltdomene antistoffer, hvor sekvensen til et anti-serum enkeltdomene antistoff tilsvarer en hvilken som helst representert ved SEQ ID nr: 16 til 19 og 49 til 61.

30

Slike konstrukter er i stand til å sirkulere i individets serum i flere dager, noe som reduserer behandlingsfrekvensen, individets ulemper og resultere i en reduksjon av kostnaden ved behandlingen. Videre, er det et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse

35

at halveringstiden av polypeptidkonstruktene beskrevet heri kan bli kontrollert av antallet anti-serum protein enkeltdomene antistoffer som er til stede i konstruktet. En kontrollerbar halveringstid er ønsket i flere sammenhenger, for eksempel, ved applikasjon av en tidsbestemt dose av et terapeutisk polypeptidkonstrukt.

5

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som nevnt heri, videre omfattende et trombolytisk middel.

10 Nevnte trombolytiske middel kan være ikke-kovalent eller kovalent bundet til et enkeltdomene antistoff via kovalente eller ikke-kovalente midler. Slike kovalente midler er beskrevet nedenfor.

Ikke-kovalente midler inkluderer samvirkning via et protein slik som biotin/streptavidin, eller via et immunokonjugat.

15

Alternativt, kan det trombolytiske middelet kan bli administrert samtidig, separat eller sekvensielt med hensyn på et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse.

20 Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er en sammensetning omfattende minst ett polypeptidkonstrukt som beskrevet heri og minst ett trombolytisk middel, for samtidig, separate eller sekvensiell administrasjon til et individ.

25 Et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er en effektiv mengde av minst ett polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse og minst ett trombolytisk middel for bruk i en fremgangsmåte for behandling ved administrasjon til et individ samtidig, separat eller sekvensielt, av autoimmun sykdom.

30 Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er et sett inneholdende minst ett polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse og minst ett trombolytisk middel for samtidig, separat eller sekvensiell administrasjon til et individ. Det er et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse at settet kan bli benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse. Det er et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse at settet kan bli benyttet for å behandle sykdommene som sitert heri.

35 Ved samtidig administrasjon blir polypeptidet og det trombolytiske middelet administrert

til et individ samtidig. For eksempel, som en blanding eller en sammensetning omfattende nevnte komponenter. Eksempels omfatter, men er ikke begrenset til en oppløsning administrert intravenøst, en tablett, væske, topikal krem, etc., hvor hvert preparat omfatter komponentene av interesse.

5

Ved separat administrasjon blir polypeptidet og det trombolytiske middelet administrert til et individ samtidig eller hovedsakelig samtidig. Komponentene er til stede i settet som separate, ublandede preparater. For eksempel, kan polypeptidet og det trombolytiske middelet være til stede i settet som individuelle tabletter. Tablettene kan bli administrert til individet ved svelging av begge tablettene samtidig eller en tablett direkte etter den andre.

Ved sekvensiell administrasjon blir polypeptidet og det trombolytiske middelet administrert til et individ sekvensielt. Polypeptidet og det trombolytiske middelet er til stede i settet som separate, ublandede preparater. Der er et tidsintervall mellom doser. For eksempel, kan en komponent bli administrert opp til 336,312, 288,264, 240,216, 192,168, 144,120, 96,72, 48,24, 20,16, 12,8, 4,2, 1, eller 0.5 timer etter den andre komponenten.

Ved sekvensiell administrasjon, kan en komponent bli administrert en gang, eller et hvilket som helst antall ganger og i forskjellige doser før og/eller etter administrasjon av den andre komponenten.

Sekvensiell administrasjon kan bli kombinert med samtidig eller sekvensiell administrasjon.

De medisinske anvendelser av polypeptidkonstruktet som beskrevet nedenfor, angår også sammensetningen omfattende et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri og minst ett polypeptisk trombolytisk middel, for samtidig, separat eller sekvensiell administrasjon til et individ som beskrevet ovenfor.

Trombolytisk midler ifølge foreliggende oppfinnelse kan inkludere, for eksempel, stafylokinase, vevplasminogen aktivator, streptokinase, enkeltkjedet streptokinase, urokinase og acyl plasminogen streptokinase kompleks.

35

- Enkeltdomene antistoffene kan være sammenføyd for å danne en hvilken som helst av polypeptidkonstruktene beskrevet heri omfattende mer enn ett enkeltdomene antistoff ved bruk av fremgangsmåter som er kjent i teknikken eller en hvilken som helst fremtidig fremgangsmåte. For eksempel, kan de være forbundet ved kjemisk
- 5 tverrbinding ved reagering av aminosyrerester med et organisk derivatiseringsmiddel slik som beskrevet av Blattler et al, Biochemistry 24,1517-1524 ; EP294703. Alternativt, kan enkeltdomene antistoffene være sammenføyd genetisk på DNA-nivå-, dvs. polynukleotidkonstrukt dannet som koder for det komplette polypeptidkonstruktet omfattende et eller flere anti-mål enkeltdomene antistoffer og et eller flere anti-serum
- 10 protein enkeltdomene antistoffer. En fremgangsmåte for fremstilling av bivalente eller multivalente VHH polypeptidkonstrukt er beskrevet i PCT patentsøknad WO 96/34103. En måte å sammenkoble multiple enkeltdomene antistoffer er via den genetiske veien ved sammenføring av enkeltdomene antistoffkodende sekvenser enten direkte eller via en peptidelinker. For eksempel, kan den C-terminale enden av
- 15 det første enkeltdomene antistoff være forbundet til den N-terminale enden av det neste enkeltdomene antistoffet. Denne linkingmodusen kan bli utvidet for å sammenføye ytterligere enkeltdomene antistoffer for konstruksjonen og produksjonen av tri-, tetra-, etc. funksjonelle konstrukt.
- 20 Polypeptidkonstruktene beskrevet heri kan bli fremstilt av fagmannen ifølge fremgangsmåter kjent i teknikken eller en hvilken som helst fremtidig fremgangsmåte. For eksempel, kan VHHs bli fremskaffet ved bruk av fremgangsmåter som er kjent i teknikken slik som ved immunising av en kamel og fremskaffelse av hybridoma's fra denne, eller ved kloning av et bibliotek av enkeltdomene antistoffer ved bruk av
- 25 molekylærbiologiske teknikker som er kjent i teknikken og påfølgende seleksjon ved bruk av pagedisplay.

- Et aspekt beskrevet heri angår funnet at polypeptider representert ved SEQ ID nr: 1 til 7 som i tabell 30 avledet fra Camelidae VHHs, binder til vWF og inhiberer dets
- 30 samvirkning med collagen.

- Derfor er en utførelsesform beskrevet heri et polypeptidkonstrukt hvor minst ett enkeltdomene antistoff tilsvarer en sekvens representert ved et hvilket som helst SEQ ID nr:1 til 7.

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved et hvilket som helst SEQ ID nr: 8 til 12. Nevnte sekvenser tilsvarer til monospesifikke polypeptidkonstrukter (slik som i SEQ ID No. 8 og 11) eller heterospesifikke polypeptidkonstrukter omfattende VHHs av
5 forskjellige sekvenser (slik som i SEQ ID No. 9,10 og 12), begge rettet mot vWF.

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt omfattende et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot vWF.

10 Blodplateaggregering er et meget komplekst fenomen og i en in vivo situasjon, skjer samvirkningen av vWF med collagen kun ved høy skjær, slik som observert i små arterier. For å undersøke blodplateaggregering under høy skjær, har oppfinnerne utført perfusjonseksperimenter. Eksempel 16 representerer skjærdata fremskaffet med de spesifikke vWF-A3 binderne SEQ ID Nr.1 til 12. Dette eksperiment er representativt for
15 samvirkningene som skjer etter skade i karveggen i en liten arterie (for eksempel under angioplasti).

Overraskende yter monovalente VHH's meget bra i et blodplateaggregering-eksperiment under høy skjær: 50% inhibering av blodplateaggregering ble oppnådd
20 ved en konsentrasjon mellom 0.08 og 0.3 µg/ml. Til sammenligning, inhiberer det IgG vWF-spesifikke antistoffet samvirkningen med collagen, 82D6A3, inhiberer 50% av blodplateaggregering ved omkring tjue ganger høyere konsentrasjon (Vanhoorelbeke K. et.al., Journal of Biological Chemistry, 2003,278 : 37815-37821). Disse resultatene var uventet gitt at IC50-veridene for det monovalente VHH's er opp til 7 ganger verre i
25 ELISA enn IC50-verdiene til IgG av 82D6A3.

Dette beviser klart at den store størrelsen til de nevnte antistoffer ikke er passende for samvirkning med makromolekyler som starter eller er i aggregeringsprosessen, slik som de involvert i blodplate-mediert aggregering. vWF danner multimerer av opp til 60
30 monomerer (endelige multimerer med størrelse opp til 20 million dalton). Faktisk har det blitt vist at ikke alle A3 domener er tilgjengelige for 82D6A3 (Dongmei WU, Blood, 2002,99, 3623 to 3628). Videre vil den store størrelsen til konvensjonelle antistoffer, begrense vevspenetrering, for eksempel, under blodplate-mediert aggregering ved setet for en skadet karvegg.

35

Nanobodies har en unik struktur som består av et enkelt variabelt domene. VHH molekyler avledet fra Camelidae antistoffer er blant de minste intakte antigen-bindingsdomener som er kjent (omkring 15 kDa, eller 10 ganger mindre enn et konvensjonelt IgG) og er således godt tilpasset til levering til tette vev og for aksessering av det begrensede rommet mellom makromolekyler som deltar i eller starter prosessen ved blodplatedmediert aggregering.

Til vår kjennskap, er dette den først gangen at eksperimenter viser at den lille størrelsen til et nanobody er fordelaktig i forhold til et stort intakt antistoff for inhibering av samvirkninger mellom slike store makromolekyler.

Trass i den lille størrelsen til nanobodies, og således fordeler for penetrering, er det likevel overraskende at et slikt lite molekyl kan inhibere samvirkninger mellom store polymerer slik som vWF (opp til 60 monomerer) og collagen og med en slik høy effektivitet. Det har blitt beskrevet at kun de store multimerer former av vWF er hemostatisk aktive (Furlan, M, . 1996, Ann.Hematol. 72: 341-348). Binding av multimerer vWF til collagen skjer ved ~100-ganger høyere affinitet enn binding av monomere vWF fragmenter.

Resultatene fra høy skjær eksperimenterne indikerer at en lavere dose kan bli administrert til pasienter. Derfor, er færre bieffekter forventet (slik som immunogenisitet- eller blødning-problemer).

Også beskrevet heri er funnet at polypeptidene tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQID nr 23 til 31 fra enkeltdomene lama antistoffer, binder til A1 domenet av vWF.

Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et polypeptidkonstrukt omfattende et eller flere enkeltdomene antistoffer, hvor minst ett enkeltdomene antistoff tilsvarer en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQID nr: 23 til 31.

En annen utførelsesform beskrevet heri er et polypeptidkonstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 32 til 34. Nevnte sekvenser tilsvarer bivalente polypeptidkonstrukt omfattende VHHs med de samme sekvensene, begge rettet mot vWF A1 domenet.

Oppfinnerne har utført perfusjonseksperiment i et strømningskammer, for å studere effekten av polypeptidkonstrukter omfattende sekvenser representert ved SEQ ID nr: 23 til 31 etter blodplateaggregering under høy skjær. Eksempel 25 viser skjærdata
5 fremskaffet med de spesifikke vWF-A1 binderne SEQ ID No. 23 til 31.

Også beskrevet heri er funnet at polypeptidene tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr 62 til 65 fra enkeltdomenelama antistoffer, binder selektivt til A1 domenet av den aktive konformasjonen av vWF (slik som etter å ha blitt
10 bundet til collagen) heller enn til fritt sirkulerende ikkeaktivert vWF. Dette resulterer i antitrombotiske midler som er både sikrere og mer effektive. Som benyttet heri, betyr "selektiv binding" benyttet med referanse til vWF A1 domener, at lama-antistoffer har minst en ti ganger og foretrukket en hundre ganger større affinitet for den aktive konformasjonen av vWF sammenlignet med den ikkeaktiverte formen.

15

Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et polypeptidkonstrukt omfattende et eller flere enkeltdomene antistoffer, hvor minst ett enkeltdomene antistoff tilsvarer en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 62 til 65.

20 I en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter et polypeptidkonstrukt et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot det samme målet, og omfatter videre et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot det samme målet, men overfor en annen epitop i det samme domenet.

25 For eksempel, er sekvensene representert ved SEQ ID nr: 9,10 og 12 heterospesifikke polypeptidkonstrukter omfattende VHHs rettet mot forskjellige epitoper i A3 domenet av vWF. Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et polypeptidkonstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 9,10 og 12.

30 En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt hvor antallet enkeltdomene antistoffer rettet mot det samme målet er to eller flere.

Sekvensene representert ved SEQ ID nr: 8 og 11 er polypeptidkonstrukter omfattende VHHs rettet mot de samme epitopene i A3 domenet av vWF, hvor begge VHHs har
35 identiske sekvenser. Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et

polypeptidkonstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 8 og 11.

- 5 Ifølge en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter et polypeptidkonstrukt et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot ett domene av det samme målet, og et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot det samme målet, men mot et annet domene på det samme målet. Eksempler på forskjellige domener kan være A1 og A3 domene av vWF.
- 10 I et annet eksempel, er sekvensene representert ved SEQID nr: 20,21 og 22 heterospesifikke polypeptidkonstrukt omfattende VHHs rettet mot epitoper på forskjellige domener vWF dvs. A1 og A3 av vWF. Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et polypeptidkonstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 20,21 og 22.
- 15 Også beskrevet heri er at minst ett VHH rettet mot A1 domenet i et heterospesifikt polypeptidkonstrukt gjenkjenner den aktive konformasjonen av vWF. Et slikt VHH tilsvarer en sekvens representert ved et hvilket som helst SEQID nr: 62 til 65.
- 20 Slike polypeptidkonstrukt kan ha overlegne anti-trombotiske effekter sammenlignet med de monomere VHH's. Perfusjonseksperimentet ble utført i et strømningskammer for å studere blodplateaggregering under høy skjær for å studere effektene av disse polypeptidkonstruktene. Eksempel 30 viser skjærdata fremskaffet med det heterospesifikke polypeptidkonstruktet omfattende anti-vWF-A1 VHH og anti-vWF-A3
- 25 VHH.
- Også beskrevet heri er funnet at polypeptidene representert ved SEQ ID nr 35 til 37 fra enkeltdomene lama antistoffer, binder til collagen type I og/eller type III.
- 30 Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et polypeptidkonstrukt, hvor minst ett enkeltdomene antistoff tilsvarer en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 35 til 37.
- I en annen utførelsesform beskrevet heri, omfatter et polypeptidkonstrukt et eller flere
- 35 enkeltdomene antistoffer rettet mot collagen I og/eller type III, og et eller flere

enkeltdomene antistoffer rettet mot det samme målet, men mot en annen epitop i det samme domenet. Sekvensene representert ved 3P1-313P2-31 og 3L-413P2-31 er heterospesifikke polypeptidkonstrukt omfattende VHHs rettet mot forskjellige epitoper i collagen type I. Derfor, er en annen utførelsesform beskrevet heri et

5 polypeptidkonstrukt tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 46 og 47.

Et annet aspekt beskrevet heri er et polypeptidkonstrukt omfattende et eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot blodplateglykoproteinet Ib.

10

Et murint anti-human vWF monoklonalt antistoff, AJvW-2(IgG), som inhiberer samvirkingen mellom blodplate glykoprotein Ib(gplb) og von Willebrand faktor (vWF) under den ristocetin- og botrocetin-indusert aggregeringen av humane blodplater (PCT publikasjonsnummer WO 00/10601), ble utviklet. AJvW-2 Fab, inhiberer repetitive

15 koronare arterietromboser uten forlenging av blødningstiden hos hunder (Kageyama S et al, Thromb Res., 2001 Mar 1; 101 (5): 395- 404) og forhindring trombusavsetning og neointimadannelse etter ballongskade i marsvin (Kageyama S, et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Oct; 20 (10): 2303-8).

20 Antistoff 6B4 er et monoklonalt antistoff (MoAb) rettet mot rensert humant gplb (PCT søknads nummer WO 01/10911 A2). Når injisert inn i bavianer, forårsaker intakt IgG og dets F (ab') 2 fragmenter nesten umiddelbar trombocytopenia, på grunn av bivalensen til F (ab') 2 som medierer blodplate tverrbinding, eller Fc: Fc reseptorsamvirkninger som medierer aktivering av blodplate aggregering

25 (Cauwenberghs N. et al, Arteriosclerosis, Trombosis og Vascular biology, 2000,20: 1347 og se for eksempel, Cadroy Y et al, Blood, 1994,83: 3218-3224, Becker BH et al, blood, 1989,74: 690-694, Ravanat C. et al, Thromb. Haemost. 1999,82: 528a sammendrag). Blodplateavsetning inn i collagen-rikt bovint pericardium ble inhibert når

30 Fab fragmentene ble injisert etter en trombus var tillat å dannes, ble ingen inhibering av videre tromboses observert.

Det ble vist at affiniteten til Fab-fragmentet for gplb reseptoren på blodplaten falt med en faktor på 10 sammenlignet med det intakte IgG eller F(ab') 2 (henholdsvis KD= 49.2

35 nM, 4.7 nM og 6.4 nM). Også IC50-verdien for ristocetin-indusert blodplateaggregering

var opp til 10 ganger verre enn Fab sammenlignet med IgG eller F (ab')₂ (henholdsvis IC₅₀ på 40 nM, 4.5 nM og 7.7 nM).

5 Det kan bli forventet at den uønskede trombocytopeni forårsaket av Fc: Fc reseptormediert aktivering av blodplateaggregering og/eller F (ab')₂-mediert tverringbinding av blodplater som har blitt observert ved bruk av intakt IgG eller F (ab')₂ terapeutisk in vivo, vil bli unngått ved anvendelsen av VHH, siden VHH ikke inneholder Fc og det ikke er bivalent. Intet tap av affinitet og aktivitet vil bli oppnådd som observert med Fab fragmentet av 6B4 da nanobodies allerede er enkeltomene
10 molekyler.

Humaniserte antistoffer

Oppdagelsen av naturlig forekommende enkeltomene antistoffer in lama, dromedar og kamel avslørte en ny klasse av terapeutiske molekyler som kombinerer fordelene
15 ved monoklonale antistoffer for eksempel spesifisitet, lav toksisitet med fordelene ved små molekyler, for eksempel vev penetrering og stabilitet. Dessverre, har utviklingen av passende terapeutiske produkter basert på disse proteinene hatt ulempen ved å være Camelidaeavledede, og således ikke humane. Non-humane proteiner inneholder aminosyrerester som kan være immunogene når injisert i en human pasient. Selv om
20 studier har vist at Camelidae-avledet VHH ikke er immunogene når injisert i mus, er erstatning av Camelidae-rester med humane rester foretrukket. Disse humaniserte polypeptidene må være hovedsakelig ikke-immunogene i mennesker, men opprettholde affiniteten og aktiviteten til villtype polypeptidet.

25 Med humanisert er det ment mutert slik at immunogenisiteten etter administrasjon i humane pasienter er liten eller ikke-eksisterende. Humanisering av et polypeptid, ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter et trinn ved erstatning av et eller flere av Camelidae-aminosyreene ved deres humane motparter, som funnet i den humane konsensussekvensen, uten at polypeptid mister sin typiske karakter, dvs.
30 humaniseringen påvirker ikke signifikant antigenbindingskapasiteten til det resulterende polypeptidet.

Oppfinnerne har bestemt aminosyrerestene i antistoffets variable domene (VHH) som kan bli modifisert uten å redusere den native affiniteten til domenet for antigenet and
35 som reduserer dets immunogenisitet med hensyn på en heterolog art; og VHH

modifisert på denne måten. Mer spesifikt, angår foreliggende oppfinnelse fremstillingen av modifisert VHHs, som blir modifisert for administrasjon til mennesker, det resulterende VHH i seg selv, og anvendelsen av slike "humanisterte" VHHs i behandlingen av sykdommer hos mennesker.

5

Oppfinnerne har også funnet at humanisering av VHH polypeptider krever introduksjonen og mutagenesen av kun et begrenset antall aminosyrer i en enkel polypeptidkjede uten dramatisk tap av bindings- og/eller inhiberingsaktivitet. Dette er i motsetning til humanisering av scFv, Fab, (Fab) 2 og IgG, som krever introduksjonen av aminosyreendringer i to kjeder, den lette og den tunge kjeden og opprettholdelse av sammensetningen av kjedene.

10

En humaniseringsteknikk kan bli utført ved en fremgangsmåte omfattende erstatningen av en hvilken som helst av de følgende rester enten alene eller i kombinasjon: FR1 posisjoner 1,5, 28 og 30, hallmark-aminosyren i posisjonene 37,44, 45 og 47 i FR2, FR3 rester 74,75, 76,83, 84,93 og 94 og posisjoner 103,104, 108 og 111 i FR4; nummerering ifølge Kabat nummereringen. Eksempler på slike humanisterte sekvenser er gitt i Tabell 30, SEQ ID Nr. 2, 38 til 41.

15

Polypeptider representert i eksempel 63 og 64 har en høy grad av homologi med human kimlinje VH DP-47. Videre humanisering krevde introduksjonen og mutagenesen av en begrenset mengde aminosyrer i enkel polypeptidkjede. Dette er i motsetning til humanisering av scFv, Fab, (Fab) 2 og IgG, som krever introduksjonen av aminosyreendringer i to kjede, den lette og den tunge kjeden og opprettholdelse av sammensetningen av de to kjedene.

20

Polypeptidene inneholder human-like rester i FR2. Humanisering krevde mutagenese av rester i FR1 i posisjon 1 og 5 som ble introdusert ved primeren benyttet for repertoarkloningen og ikke opptrer naturlig i lamasekvensen. Mutagenese av disse restene resulterer ikke i tap av binding og/eller inhiberingsaktivitet. Humanisering av FR1 kraver også mutagenese av posisjon 28 og 30. Mutagenese av de restene resulterte heller ikke i tap av bindings- og/eller inhiberingsaktivitet.

30

Humanisering krever også mutagenese av rester i FR3 i posisjon 74,75, 76,83, 84,93, 94. Mutagenese av disse restene resulterte ikke i tap av bindings- og/eller

35

inhiberingsaktivitet.

Humanisering krever også mutagenese av rester i FR4 i posisjon 104,108 og 111.

5 Mutagenese av Q108L resulterte i lavere produksjonsnivå i *Escherichia coli*. Posisjon 108 er løsemiddeleksponert i kamelid VHH, mens denne posisjonen i humane antistoffer er begravet i VHVL grenseflaten (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). I isolert VHS er posisjon 108 løsemiddeleksponert. Introduksjonen av en non-polar hydrofon Leu i stedet for polar uladd Gln kan ha drastisk effekt på den intrinsiske foldbarheten/stabiliteten til molekylet.

10

En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for humanisering av et VHH omfattende trinnene:

erstatning av et hvilket som helst de følgende restene alene eller i kombinasjon:

FR1 posisjoner 1,5, 28 og 30,

15

hallmark-aminosyren i posisjon 37,44, 45 og 47 i FR2,

FR3 rester 74,75, 76,83, 84,93 og 94,

og posisjoner 103,104, 108 og 111 i FR4

nummerering ifølge Kabat-nummereringen.

20

Eksempler på slike humaniserte sekvenser er gitt i Tabell 30, SEQ ID Nr. 2, 38 til 41.

Anvendelsen av antistoffer avledet fra kilder slik som mus, sau, geit, kanin etc. , og humaniserte derivater derav som en behandling av betingelser som krever en modulering av blodplate-assosiert aggregering, er problematisk av flere grunner.

25

Tradisjonelle antistoffer er ikke stabile ved romtemperatur, og må bli nedkjølt for fremstilling og lagring, krever nødvendig nedkjølt laboratorieutstyr, lagring og transport, noe som bidrar til tid og kostnad. Kjølning er noen ganger ikke mulig i utviklingsland.

Utbyttene ved ekspresjon av nevnte Fab molekyler er meget lave og fremgangsmåten for fremstilling er meget arbeidsintensive. Videre, er fremstillingen eller småskala

30

fremstillingen av nevnte antistoffer kostbar på grunn av at det mammalske cellulære systemet som er nødvendig for ekspresjon av intakte og aktive antistoffer, krever høye nivåer av støtte i form av tid og utstyr, og utbyttene er meget lave. Videre har tradisjonelle antistoffer en bindingsaktivitet som avhenger av pH, og således ikke passer anvendelse i miljøer utenfor vanlig fysiologisk pH-område, slik som for

35

eksempel, ved behandling av gastriske blødninger, magekirurgi. Videre, er tradisjonelle

antistoffer ustabile ved lav eller høy pH og passer således ikke for oral administrasjon. Imidlertid, har det blitt vist at kamelide antistoffer motstår tøffe betingelser, slik som ekstrem pH, denaturerende reagenser og høye temperaturer (Ewert S et al, Biochemistry 2002 Mar 19; 41 (11): 3628-36), noe som gjør dem passende for oral administrasjon. Videre, har tradisjonelle antistoffer en bindingsaktivitet som avhenger av temperaturen, og er således uegnet for anvendelser i analyser og sett utført ved temperaturer utenfor biologiske aktive temperaturområder, (f.eks. 37 ± 20 °C).

Polypeptidkonstrukter representert ved SEQ ID nr: 1 til 47 og 49 til 65 og deres derivater innehar ikke kun de fordelaktige karakteristikken til konvensjonelle antistoffer, slik som lav toksisitet og høy selektivitet, men de viser også andre egenskaper. De er mer oppløselige, noe som betyr at de kan bli lagret og/eller administrert i høyere konsentrasjoner sammenlignet med konvensjonelle antistoffer. De er stabile ved romtemperatur, noe som betyr at de kan bli fremstilt, lagret og/eller transportert uten anvendelsen av kjøleutstyr, noe som gir kostnads-, tids og miljøbesparelser (beskrevet i eksempel 61). Andre fordelaktige karakteristikk sammenlignet med konvensjonelle antistoffer omfatter kort halveringstid i sirkulasjon, som kan bli modulert ifølge foreliggende oppfinnelse ved, for eksempel, albuminkopling, et bi-spesifikt nanobody med en spesifisitet mot albumin og den andre mot målet, Fc-kobling, VHH-kobling (bivalent VHHs) eller ved pegylering (beskrevet i eksempel 41 til 54). En kort og kontrollerbar halveringstid er ønskelig, for eksempel for kirurgiske prosedyrer, som krever en inhibering av blodplate-mediert aggregering i en begrenset tidsperiode. Når blødningsproblemer opptrer eller andre komplikasjoner, kan doseringen bli umiddelbart redusert.

Polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse opprettholder også bindingsaktiviteten ved en pH og temperatur utenfor de vanlige fysiologiske områdene, noe som betyr at de kan være nyttige i situasjoner med ekstrem pH og temperatur som krever en modulering av blodplate-mediert aggregering, slik som ved magekirurgi, kontroll av mageblødning, analyse utført ved romtemperatur etc. Polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse viser også en forlenget stabilitet ved ekstrem pH, noe som betyr at de passer bra for levering ved oral administrasjon. Polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli kost-effektivt produsert ved fermentering i passende rekombinante vertsorganismer slik som *Escherichia coli* og gjær; til forskjell fra konvensjonelle antistoffer som også krever kostbare mammalske cellekulturanlegg, de

oppnåelige ekspresjonsnivåene er høye. Eksempler på utbytter av polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse er 1 til 10mg/ml (E. coli) og opp til 1g/l (gjær). Polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse viser også høy bindingsaffinitet for et brett område av forskjellige antigentyper, og evne til å binde til epitoper som ikke blir gjenkjent av konvensjonelle antistoffer; for eksempel viser de lange CDR baserte loop-strukturer med potensiale til å penetrere inn i kaviteter og utøve enzymfunksjoninhibering. Videre, siden binding ofte opptrer kun gjennom CDR3-loopen, er det antatt at peptider avledet fra CDR3 kan bli benyttet terapeutisk (Desmyter et.al. J Biol Chem, 2001,276 : 26285-90). Fremstillingen av slike peptider er beskrevet i Eksempel 65. Polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse er også i stand til å opprettholde full bindingskapasitet som fusjonsprotein med et enzym eller toksin. Videre, kan det bli forventet at den uønskede trombocytopeni forårsaket av Fc: Fc reseptormediert aktivering av blodplate-aggregering og/eller F (ab') (2)-mediert tverrbinding av blodplater som har blitt observert ved bruk av intakt IgG eller F (ab') (2) terapeutisk in vivo (se Cauwenberghs N. et.al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular biology, 2000,20 : 1347), vil bli unngått ved anvendelsen av VHH, siden VHH ikke inneholder noe Fc og den ikke er bivalent. Polypeptidene representert ved SEQ ID nr: 1 til 15,20 til 47,62 til 65, homologe eller funksjonelle deler derav gir en betydelig besparelse i kostnad og tid ved behandlingen og diagnose av betingelser relatert til blodplate-mediert aggregering, og pasienten som har behov for nevnte polypeptider vil møte færre av problemene assosiert med konvensjonelle midler.

Blodplate-mediert aggregering er prosessen hvor vWF-bundet collagen vedheftes til blodplater og/eller blodplatereseptorene (eksempler på begge er gpla/IIa,gplb, eller collagen), til sist resulter dette i blodplateaktivering. Blodplateaktivering fører til fibrinogenbinding, og til sist til blodplateaggregering. Det er innen rammen av foreliggende oppfinnelse å fremskaffe polypeptider som modulerer prosessene som omfatter blodplate-mediert aggregering slik som vWF-collagenbinding, vWF-blodplate reseptoradhesjon, collagen-blodplate reseptoradhesjon, blodplateaktivering, fibrinogenbinding og/eller blodplateaggregering. Nevnte polypeptider er avledet fra Camelidae antistoffer rettet mot vWF, vWFA1, A1 domene av aktivert vWF eller A3 domener, gplb eller collagen, og deler de samme fordeler som polypeptidene representert ved SEQ ID nr:1 til 15,20 til 47 og 62 til 65, som beskrevet ovenfor.

Ifølge et aspekt av foreliggende oppfinnelse kan et polypeptidkonstrukt være en

- homolog sekvens av et full-lengde polypeptidkonstrukt. Ifølge et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse, kan et polypeptidkonstrukt være en funksjonell del av et full-lengde polypeptidkonstrukt. Ifølge et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse, kan et polypeptidkonstrukt være en homolog sekvens av et fulllengde
- 5 polypeptidkonstrukt. Ifølge et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse, kan et polypeptidkonstrukt være en funksjonell del av en homolog sekvens av et fulllengde polypeptidkonstrukt. Ifølge et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse kan et polypeptidkonstrukt omfatte en sekvens av et polypeptidkonstrukt.
- 10 Ifølge et aspekt av foreliggende oppfinnelse kan et enkeltdomene antistoff benyttet for å danne et polypeptidkonstrukt kan være et komplett enkeltdomene antistoff (f.eks. et VHH) eller en homolog sekvens derav. Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, kan et enkeltdomene antistoff benyttet for å danne polypeptidkonstruktet være en funksjonell del av et komplett enkeltdomene antistoff. Ifølge et annet aspekt av
- 15 foreliggende oppfinnelse, kan et enkeltdomene antistoff benyttet for å danne polypeptidkonstruktet være en homolog sekvens av et komplett enkeltdomene antistoff. Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, kan et enkeltdomene antistoff benyttet for å danne polypeptidkonstruktet være en funksjonell del av en homolog sekvens av et komplett enkeltdomene antistoff.
- 20 Et annet aspekt beskrevet heri er enkeltdomene antistoffene tilsvarende til et hvilket som helst SEQ ID nr: 1 til 7, 16 til 19, 23 til 31, 35 til 41, og 49 til 65, en homolog sekvens derav, og/eller en funksjonell del derav.
- 25 Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse kan et polypeptidkonstrukt være en homolog sekvens av morsekvensen. Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, kan et polypeptidkonstrukt være en funksjonell del av morsekvensen. Ifølge et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse, kan et polypeptidkonstrukt være en funksjonell del av en homolog sekvens av morsekvensens.
- 30 Som benyttet heri, kan en homolog sekvens omfatte addisjoner, delesjoner eller substitusjoner av en eller flere aminosyrer, som ikke betydelig endrer de funksjonelle karakteristikkene til polypeptidet. Antallet aminosyredelesjoner eller -substitusjoner er fortrinnsvis opp til 1,2, 3,4, 5,6, 7,8, 9,10, 11,12, 13,14, 15,16, 17,18, 19,20, 21,22,
- 35 23,24, 25,26, 27,28, 29, 30,31, 32,33, 34,35, 36,37, 38,39, 40,41, 42,43, 44,45, 46,47,

48,49, 50,51, 52,53, 54, 55,56, 57,58, 59,60, 61,62, 63,64, 65,66, 67,68, 69 eller 70 aminosyrer.

5 En homolog sekvens beskrevet heri omfatter polypeptider forlenget ved addisjon av aminosyrer for å danne humant tungkjede antistoff eller humant enkeltomene tungkjede antistoff, som ikke betydelig endrer de funksjonelle karakteristikkene til det umodifiserte polypeptidet.

10 En homolog sekvens beskrevet heri kan omfatte et polypeptid representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 1 til 47 og 49 til 65, som har blitt humanisert (som beskrevet i eksempel 63 og 64).

15 En homolog sekvens ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte en sekvens tilsvarende til sekvensen av en hvilken som helst SEQ ID nr: 1 til 47 og 49 til 65 som eksisterer i andre Camelidae arter slik som, for eksempel, kamel, lama, dromedar, alpakka, guansko etc.

20 Hvor homolog sekvens indikerer sekvensidentitet, betyr det en sekvens som representer en høy sekvensidentitet (mer enn 70%,75%, 80%, 85%, 90%, 95% eller 98% sekvensidentitet) med morsekvensen, og er foretrukket karakterisert ved tilsvarende egenskaper som morsekvensen, nemlig affinitet, hvor nevnte identitet er beregnet ved bruk av kjente fremgangsmåter.

25 Alternativt, kan en homolog sekvens også være en hvilken som helst aminosyresekvens som er resultat av tillatte substitusjoner ved et hvilket som helst antall posisjoner på morsekvensen ifølge formelen nedenfor:

Ser substituert med Ser, Thr, Gly, og Asn;

Arg substituert med en av Arg, His, Gln, Lys, og Glu;

Leu substituert med en av Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, og Val;

30 Pro substituert med en av Pro, Gly, Ala, og Thr;

Thr substituert med en av Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His, og Gln;

Ala substituert med en av Ala, Gly, Thr, og Pro;

Val substituert med en av Val, Met, Tyr, Phe, Ile, og Leu;

Gly substituert med en av Gly, Ala, Thr, Pro, og Ser; Ile

35 Substituert med en av Ile, Met, Tyr, Phe, Val, og Leu;

Phe substituert med en av Phe, Trp, Met, Tyr, Ile, Val, og Leu;

Tyr substituert med en av Tyr, Trp, Met, Phe, Ile, Val, og Leu;

His substituert med en av His, Glu, Lys, Gin, Thr, og Arg;

Gin substituert med en av Gin, Glu, Lys, Asn, His, Thr, og Arg;

5 Asn substituert med en av Asn, Glu, Asp, Gin, og Ser;

Lys substituert med en av Lys, Glu, Gin, His, og Arg;

Asp substituert med en av Asp, Glu, og Asn;

Glu substituert med en av Glu, Asp, Lys, Asn, Gin, His, og Arg;

Met substituert med en av Met, Phe, Ile, Val, Leu, og Tyr.

10

En homolog ifølge foreliggende oppfinnelse kan referere til nukleotidsekvenser med mer enn 50,100, 200,300, 400,500, 600,800 eller 1000 nukleotider som kan hybridisere til revers-komplement av nukleotidsekvensene som kan kode for et polypeptid under stringente hybridiseringsbetingelser (slik som de beskrevet av SAMBROOK et al.,

15 Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, New York).

Som benyttet heri, angår en funksjonell del et enkeltdomene antistoff med tilstrekkelig lengde slik at samvirkningen av interesse blir opprettholdt med affinitet på 1×10^{-6} M

20 eller bedre.

Alternativt omfatter en funksjonell del av et enkeltdomene antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse en partiell delesjon av den fullstendige aminosyresekvensen og opprettholder likevel bindingssetet (ene) og proteindomenet (ene) som er nødvendige for bindingen av og samvirkningen med målet.

25

Alternativt er en funksjonell del av en hvilken som helst SEQ ID nr: 1 til 7 et polypeptid som omfatter en partiell delesjon av den fullstendige aminosyresekvensen og som likevel opprettholder bindingssetet (ene) og proteindomenet (ene) som er nødvendige for inhiberingen av bindingen av vWF til collagen.

30

Alternativt er en funksjonell del av et hvilket som helst SEQ ID nr: 23 til 31 og 62 til 65 et polypeptid som omfatter en partiell delesjon av den fullstendige aminosyresekvensen og som fremdeles opprettholder bindingssete (ne) og proteindomenet (ene) som er nødvendige for bindingen av og samvirkning med A1

35

domenet av vWF.

Alternativt er en funksjonell del av et hvilket som helst SEQ ID nr: 35 til 37 et polypeptid som omfatter en partiell delesjon av den fullstendige aminosyresekvensen og som fremdeles opprettholder bindingssetet (ene) og proteindomenet (ene) som er
5 nødvendige for bindingen av og samvirkning med collagen.

Alternativt en funksjonell del omfatter en partiell delesjon av den fullstendige aminosyresekvensen av et polypeptid og som fremdeles opprettholder bindingssetet (ene) og proteindomenet (ene) som er nødvendige for bindingen av og samvirkning med antigenet mot hvilket det ble fremmet. Det inkluderer, men er ikke begrenset til VHH domener.
10

Som benyttet heri, en funksjonell del som angår en polypeptidsekvens angår mindre enn 100% av sekvensen (f.eks. , 99%, 90%, 80%, 70%, 60% 50% etc.), men omfatter 5 eller flere aminosyrer.
15

En del som angår en nukleotidsekvens som koder for en polypeptidsekvens, angår mindre enn 100% av sekvensen (f.eks. , 99%, 90%, 80%, 70%, 60% 50% etc.), men omfattende 15 eller flere nukleotider.
20

Et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er administrasjonen av et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse hvor man kan unngå behovet for injeksjon. Konvensjonelle antistoff-baserte terapeutika har signifikant potensiale som medikamenter, fordi de har utmerket spesifisitet til sine mål og en lav egen toksisitet, imidlertid har de en viktig ulempe: de er relativt ustabile, og er sensitive for nedbrytning av proteaser. Dette betyr at konvensjonelle antistoffmedikamenter ikke kan bli administrert oralt, sublingvalt, topically, nasalt, vaginalt, rektalt eller ved inhalering, på grunn av at de ikke er resistente mot den lave pH på disse stedene, virkningen av proteaser på disse stedene og i blodet og/eller på grunn av deres store størrelse. De må bli administrert ved injeksjoner (intravenøst, subkutant, etc.) for å overvinne noen av disse problemene. Administrasjon ved injeksjon krever spesialisttrening for å anvende en hypodermisk sprøyte eller nål korrekt og sikkert. Det krever videre sterilt utstyr, en væskeformulering av det terapeutiske polypeptidet, pakking i glass av nevnte polypeptid i en steril og stabil form og, for individet, et passende sted for å sette nålen.
25
30
35

Videre, erfarer individer ofte fysisk eller fysiologisk stress før og ved mottak av en injeksjon.

5 Et aspekt av foreliggende oppfinnelse overviner disse problemene ifølge kjent teknikk, ved å fremskaffe polypeptidkonstrukter ifølge foreliggende oppfinnelse. Nevnte konstrukter er tilstrekkelig små, resistente og stabile til å bli levert oralt, sublingvalt, topikalt, nasalt, vaginalt, rektalt eller ved inhalering hovedsakelig uten tap av aktivitet. Polypeptidkonstruktene ifølge foreliggende oppfinnelse som unngår behovet for injeksjoner, er ikke bare kostnads- og tidsbesparende, men er også mer bekvemme og 10 mer komfortable for individet.

En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse ved behandling, forhindring og/eller lettelse av symptomene på forstyrrelser som er mottakelige for modulering av et stoff som 15 kontrollerer blodplatedmediert aggregering som er i stand til å passere gjennom magemiljøet uten å bli inaktivert.

Som kjent av fagmannen, straks man innehar nevnte polypeptidkonstrukt, kan formuleringsteknologi bli benyttet for å frigi en maksimal mengde av polypeptid på det 20 rette stedet (i magen, i kolon etc.). Denne fremgangsmåten for levering er viktig for behandlingen, forhindringen og/eller lettelsen av symptomene på forstyrrelser hvis mål er lokalisert i tarmsystemet.

Et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri 25 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling, forhindring og/eller lettelse ved oral administrasjon til et individ, av symptomene på en forstyrrelse som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering som er i stand til å passere gjennom miljøet i magen uten å bli inaktivert.

30 En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandling, forhindring og/eller lettelse av symptomene på forstyrrelser som er mottakelige for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering, som er i stand til å passere gjennom miljøet i magen uten å bli inaktivert.

35

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse i behandling, forhindring og/eller lettelse av symptomer eller forstyrrelser som er mottakelige for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering levert til den vaginale og/eller rektal trakt.

5

I et ikke-begrensede eksempel, en formulering ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri, i form av en gel, krem, stikkpille, film, eller i form av en svamp eller som en vaginal ring som sakte frigir den aktive ingrediens over tid (slike formuleringer er beskrevet i EP 707473, EP 684814, US 10 5629001).

10

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering levert til den 15 vaginale og/eller rektale trakt.

15

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri, for anvendelse i behandling, forhindring og/eller letting symptomene på 20 forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering levert til nesen, den øvre respirasjonstrakten og/eller lungen.

20

I et ikke-begrensede eksempel, omfatter en formulering ifølge foreliggende 25 oppfinnelse, et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri i form av en nesenspray (f.eks. en aerosol) eller inhalator. Siden polypeptidkonstruktet er lite, kan det nå sitt mål mer effektivt enn terapeutiske IgG molekyler.

25

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et 30 polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser som er mottakelige for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering levert til nesen, den øvre respiratoriske trakten og/eller lungen, uten at nevnte polypeptid blir inaktivert.

30

35

En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse i behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatemediert aggregering levert til den intestinale mucosa, hvor nevnte forstyrrelse øker permeabiliteten til den intestinale mucosa. På grunn av deres lille størrelse, kan et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri passere gjennom den intestinale mucosa og nå blodstrømmen mer effektivt i individer som lider av forstyrrelser som forårsaker økning i permeabiliteten av den intestinale mucosa.

10 Denne prosessen kan bli ytterligere forbedret ved et ytterligere aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelsen av aktive transportbærere. Ifølge dette aspektet ifølge foreliggende oppfinnelse, blir VHH sammenføyet med en bærer som øker overføringen gjennom den intestinale veggen inn i blodstrømmen. I et ikkebegrensede eksempel, er denne "bæreren" et andre VHH som er sammenføyd med det terapeutiske VHH. Slike fusjonskonstrukter blir fremstilt ved bruk av fremgangsmåter kjent i teknikken. "Bærer"-VHH binder spesifikt til en reseptor på den intestinale veggen som induserer en aktiv overføring gjennom veggen.

20 En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandling, forhindring og/eller letting av symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatemediert aggregering levert til den intestinal mucosa, hvor nevnte forstyrrelse øker permeabiliteten til den intestinale mucosa.

25 Denne prosessen kan bli enda mer forbedret ved et ytterligere aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelsen av aktive transport bærere. Ifølge dette aspektet av foreliggende oppfinnelse, blir et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri sammenføyet med en bærer som øker dets overføring gjennom den intestinale veggen inn i blodstrømmen. I et ikkebegrensede eksempel, er denne "bæreren" et VHH som er sammenføyd med nevnte polypeptid. Slike fusjonskonstrukter blir fremstilt ved bruk av fremgangsmåter kjent i teknikken. "Bærer" VHH binder spesifikt til en reseptor på den intestinale veggen som induserer en aktiv overføring gjennom veggen.

35 En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som

beskrevet heri for anvendelse i behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering som er i stand til å passere gjennom vevene under tungen effektivt. En formulering av nevnte polypeptidkonstrukt som beskrevet heri, for eksempel, en tablett, spray, dråpe blir plassert under tungen og adsorbert gjennom mucusmembranene inn i det kapillære nettverket under tungen.

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandling, forhindring og/eller letting av symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering som er i stand til å passere gjennom vevene under tungen.

En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse i behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering som er i stand til å passere effektivt gjennom huden.

En formulering av nevnte polypeptidkonstrukt, for eksempel, en krem, film, spray, dråpe, plaster, blir plassert på huden og passerer gjennom.

En annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser som er mottakelig for modulering av et stoff som kontrollerer blodplatedmediert aggregering som er i stand til å passere effektivt gjennom huden.

I en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri videre et bærer enkeltomene antistoff (f.eks. VHH) som virker som en aktiv transportbærer for transport av nevnte polypeptidkonstrukt via lungelumen til blodet.

Et polypeptidkonstrukt videre omfattende en bærer som binder spesifikt til en reseptor som er til stede på den mucosale overflaten (bronkiale, epiteliale celler) resulterer i den aktive transport av polypeptidet fra lungelumen til blodet. Bærer enkeltomene

antistoffet kan være fusert til polypeptidkonstruktet. Slike fusjonskonstrukter blir fremstilt ved bruk av fremgangsmåter som er kjent i teknikken og er beskrevet heri. "Bærer «enkeltdomene antistoffet binder spesifikt til en reseptor på den mukosale overflaten som induserer en aktiv overføring gjennom overflaten.

5

Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for å bestemme hvilke enkeltdomene antistoffer (f.eks. VHHs) som aktivt blir transportert inn i blodstrømmen etter nasal administrasjon. Tilsvarende kan et native eller immun VHH fagbibliotek bli administrert nasalt og etter forskjellige tidspunkter etter administrasjon, kan blod eller organer bli isolert for å gjenvinne fag som har blitt aktivt transportert til blodstrømmen. Et ikke-begrensende eksempel på en reseptor for aktiv transport fra lungelumen til blodstrømmen er Fc-reseptoren N (FcRn). Et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer VHH molekyler identifisert ved fremgangsmåten. Slike VHH kan så bli benyttet som en bærer VHH for leveringen av et terapeutisk VHH til det tilsvarende målet i blodstrømmen etter nasal administrasjon.

10

En utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse i behandling, forhindring og/eller letting symptomene på forstyrrelser relatert til blodplatedmediert aggregering eller dysfunksjon derav. Nevnte forstyrrelser inkluderer, trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP), transient cerebralt ischemisk attack, ustabil eller stabil angina pectoris, cerebralt infarkt, myocardialt infarkt, perifer arteriell okklusiv sykdom, restenose. Nevnte forstyrrelser omfatter videre de som har opphav fra koronar by-pass implantat, koronar arterieventilerstatning og koronare intervensjoner slik som angioplasti, stenting, eller aterektomi.

20

Andre forstyrrelser er en hvilken som helst dannelsen av en ikke-okklusiv trombus, dannelsen av en okklusiv trombus, arteriell trombusdannelse, akutt koronare okklusjon, restenosis, restenosis etter PCTA eller stenting, trombusdannelse i stenoserter arterier, hyperplasia etter angioplasti, atherektomi eller arteriell stenting, okklusivt syndrom i et vaskulært system eller mangel på åpenhet i syke arterier.

25

Et aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse i behandlingen, forhindringen og/eller lettelse av forstyrrelser eller betingelser relatert til blodplate-mediert aggregering eller dysfunksjon derav, hvor nevnte polypeptidkonstrukt blir administrert intravenøst, subkutant, oralt, sublingvalt,

30

35

tilkalt, nasalt, vaginalt, rektalt eller ved inhalasjon.

- Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for
- 5 behandling, forhindring og/eller lettelse av forstyrrelser eller betingelser relatert til blodplate-mediert aggregering eller dysfunksjon derav, hvor nevnte polypeptidkonstrukt blir administrert intravenøst, subkutant, oralt, sublingvalt, topikalt, nasalt, vaginalt, rektalt eller ved inhalasjon.
- 10 Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri for anvendelse i behandlingen, forhindring og/eller lettelse av forstyrrelser eller betingelser relatert til blodplate-mediert aggregering eller dysfunksjon derav.
- 15 Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av et polypeptid som beskrevet heri for fremstillingen av et medikament for behandlingen, forhindring og/eller lettelse av forstyrrelser eller betingelser relatert til blodplate-mediert aggregering eller dysfunksjon derav.
- 20 Man kan benytte et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse for å screene for midler som modulerer bindingen av polypeptidet til et vWF (eller gplb eller kollagen). Når de er identifisert i en analyse som måler binding eller nevnte polypeptidfortrengning alene, må midlene bli utsatt for funksjonell testing for å bestemme om de virker som modulatorer for blodplatemediert aggregering.
- 25 I et eksempel på et fortrennings eksperiment, blir fag eller celler som uttrykker vWF eller et fragment derav inkubert i bindingsbuffer med, for eksempel, et polypeptid representert ved SEQ ID nr:1 som har blitt merket, i nærvær eller fravær av økende konsentrasjoner av en kandidat modulator. For å validere og kalibrere analysen, kan
- 30 kontroll fortrenningsreaksjoner ved bruk av økende konsentrasjoner av nevnte polypeptid og som er umerket, bli utført. Etter inkubering, blir cellene vasket grundig, og bundet, merket polypeptid blir målt med passende midler for det gitte merket (f.eks., scintillasjonstelling, fluorescens, etc.). En reduksjon på minst 10% i mengden av merket polypeptid bundet i nærvær av kandidatmodulator indikerer fortrenning av
- 35 binding av kandidatmodulatorene. Kandidatmodulatorer er antatt å binde spesifikt i

denne eller andre analyser beskrevet heri dersom de fortrenger 50% av merket polypeptid (undermettings polypeptiddose) ved en konsentrasjon på 1 μ M eller mindre. Naturligvis, kan fremgangsmåten ovenfor enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidene representert ved

5 SEQ ID nr: 2 til 15, 20 til 47 og 62 til 65 eller polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

Alternativt, kan binding eller fortregning av binding bli målt ved overflate plasmon resonans (SPR). Overflate plasmon resonans-analyser kan bli benyttet som en

10 kvantitativ fremgangsmåte for å måle binding mellom to molekyler ved endringen i masse nær en immobilisert sensor som er forårsaket ved bindingen eller tap av binding av, for eksempel, polypeptidet representert ved SEQ ID nr: 1 fra den vandige fasen til et vWF, eller fragment derav immobilisert i en membran på sensoren. Denne endringen

15 i masse blir målt som resonansenheter versus tid etter injeksjon eller fjerning av det nevnte polypeptidet eller kandidatmodulator og blir målt ved bruk av en Biacore Biosensor (Biacore AB). vWF, eller fragment derav kan for eksempel være immobilisert på en sensorchip (for eksempel, forskningsgrad CM5 chip; Biacore AB) i en tyntfilm lipidmembran ifølge fremgangsmåter beskrevet av Salamon et al. (Salamon et al.,

20 1996, Biophys J. 71: 283-294; Salamon et.al., 2001, Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon et.al., 1999, Trends Biochem. Sci. 24:213-219, hver av hvilke er innlemmet heri som referanse.). Sarrío et al. Demonstrerte at SPR kan bli benyttet for å detektere ligandbinding til GPCR A(1) adenosinreseptor immobilisert i et lipid lag på chipen (Sarrío et.al., 2000, Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174, innlemmet heri som referanse).

25 Betingelser for bindingen av et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse i en SPR-analyse kan bli fininnstilt av fagmannen ved bruk av betingelsene reportert v Sarrío et. al. som et utgangspunkt. Naturligvis kan fremgangsmåten ovenfor enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidkonstruktene beskrevet heri og makromolekyler involvert i blodplate-mediert

30 aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

SPR kan analysere for modulatorer for binding på minst to måter. Først, kan et polypeptid representert ved SEQ ID nr: 1, for eksempel, bli pre-bundet til immobilisert vWF, eller fragment derav, fulgt av injeksjon av kandidatmodulator ved en

35 konsentrasjon i området fra 0,1 nM til 1 μ M. Fortregning av det bundne polypeptidet

kan bli kvantifisert, for å tillate deteksjon av modulatorbinding. Alternativt, kan det membran-bundne vWF, eller fragment derav bli pre-inkubert med en kandidatmodulator og utfordret med, for eksempel, et polypeptid representert ved SEQ ID nr: 1. En forskjell i bindingsaffinitet mellom nevnte polypeptid og vWF, eller fragment derav pre-inkubert med modulatorene, sammenlignet med den mellom nevnte polypeptid og vWF, eller fragment derav i fravær av modulatorene vil demonstrere binding eller fortregning av nevnte polypeptid i nærvær av modulator. I hvilken som helst av analysene, indikerer en reduksjon på 10% eller mer i mengden av nevnte polypeptid bundet i nærvær av kandidat modulator, i forhold til mengden av nevnte polypeptid bundet i fravær av kandidatmodulator indikerer at kandidatmodulatorene inhiberer samvirkningen av vWF, eller fragment derav og nevnte polypeptid. Naturligvis, kan fremgangsmåten ovenfor enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorene som endrer bindingen mellom polypeptidene representert ved SEQ ID nr: 2 til 15, 20 til 47 og 62 til 65 eller polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb, eller collagen, eller et fragment derav.

En annen fremgangsmåte for detektering av inhibering av binding av, for eksempel, et polypeptid representert ved SEQ ID nr: 1 til 15, 20 til 34, 38 til 45 eller 62 til 65 til vWF, eller fragmenter derav benytter fluorescens resonansenergioverføring (FRET). FRET er et kvantemekanisk fenomen som opptrer mellom en fluorescensdonor (D) og en fluorescensakseptor (A) som er meget nær hverandre (vanligvis < 100Å separasjon) dersom emisjonsspekteret til D overlapper med eksitasjonsspekteret til A. Molekyler som skal testes, f.eks. et polypeptid representert ved SEQ ID nr: 1 og et vWF, eller fragment derav, blir merket med et komplementært par av donor- og akseptorfluoroforer. Mens de er bundet nær sammen ved vWF: polypeptid-samvirkningen, fluorescens emittert etter eksitasjon av donorfluoroforen, vil ha en bølgelengde som er forskjellig fra den emittert som en respons på eksitasjonsbølgelengden når nevnte polypeptid og vWF, eller fragment derav ikke er bundet, sikrer kvantifisering av bundne versus ikke-bundne molekyler ved måling av emisjonsintensiteten ved hver bølgelengde. Donorfluoroforer som man kan merke vWF, eller fragment derav med er velkjent i teknikken. Av spesiell interesse er varianter av A. Victoria GFP kjent som Cyan FP (CFP, Donor (D)) og Yellow FP (YFP, Acceptor (A)). Som et eksempel, kan YFP-varianten bli fremstilt som et fusjonsprotein med vWF, eller fragment derav. Vektorer for ekspresjonen av GFP varianter som fusjoner

(Clontech) så vel som fluoro-merkede reagenser (Molecular Probes) er kjent i teknikken. Tilsetningen av en kandidatmodulator til blandingen av fluorescens-merket polypeptid og YFP-vWF vil resultere i en inhibering av energioverføring som fremkommer, for eksempel, ved en reduksjon i YFP fluorescens relativt til en prøve uten kandidatmodulatoren. I en analyse ved bruk av FRET for deteksjonen av vWF: polypeptid samvirkning, indikerer enn 10% eller større reduksjon i intensiteten av fluorescensemisjon ved akseptorens bølgelengde i prøver som inneholder en kandidat modulator, relativt til prøver uten kandidatmodulatoren, at kandidatmodulatoren inhiberer vWF: polypeptid-samvirkningen. Naturligvis, kan fremgangsmåten ovenfor enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidene representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 2 til 15,20 til 47,62 til 65 eller polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

15

En variasjon på FRET benytter fluorescensquenching for å monitorere molekylære samvirkninger. Ett molekyl i samvirkningsparet kan bli merket med en fluorofoer, og det andre med et molekyl som slukker fluorescensen til fluoroforen når den blir brakt i tett nærhet til denne. En endring i fluorescens etter eksitasjon er indikativ for en endring i assosiasjonen av molekylene merket med fluorofore:quencher-paret. Generelt, er en reduksjon i fluorescens av det merkede vWF, eller fragment derav indikativ for at polypeptidmolekylet (f.eks. et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse) som bærer quencheren, har blitt fortrent. For quenching-analyser, indikerer en 10% eller større økning i intensiteten av fluorescentemisjon i prøver inneholdende en kandidat modulator, relativt til prøver uten kandidatmodulatoren, at kandidatmodulatoren inhiberer vWF: polypeptid-samvirkningen. Naturligvis kan fremgangsmåtene ovenfor enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

30

I tillegg til overflate plasmon resonans- og FRET fremgangsmåtene, er fluorescens polarisasjonsmålinger nyttige for kvantifisering av binding.

Fluorescenspolarisasjonsverdi for fluorescerende merket molekyl avhenger av rotasjonskorrelasjonstiden eller tumlingsraten.

35

Komplekser, slik som de dannet ved vWF, eller fragment derav som er assosiert med et fluorescens merket polypeptid (f.eks. et fluorescens-merket polypeptid representert ved et hvilket som helst SEQ ID nr: 1 til 15, 20 til 34,38 til 45 og 62 til 65), har høyere polariseringsverdier en ikke-komplekسدannet, merket polypeptid. Inklusjonen av en kandidat-inhibitor av vWF: polypeptid-samvirkningen resulterer i en reduksjon i fluorescenspolarisering, relativt til en blanding uten kandidat-inhibitoren, dersom kandidat-inhibitoren ødelegger eller inhiberer samvirkningen av vWF, eller fragment derav med nevnte polypeptid. Fluorescenspolarisering passer godt for identifikasjonen av små molekyler som ødelegger dannelsen av vWF: polypeptid-komplekser. En reduksjon på 10% eller mer i fluorescenspolarisering i prøver inneholdende en kandidatmodulator, relativt til fluorescenspolarisering i en prøve som mangler kandidatmodulator, indikerer at kandidatmodulatoren inhiberer vWF: polypeptid-samvirkningen. Naturligvis kan fremgangsmåten ovenfor enkelt bli anvendt for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler som er involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

Et annet alternativ for monitorering av vWF: polypeptid-samvirkninger benytter en biosensoranalyse. ICS biosensorer har blitt beskrevet i teknikken (Australian Membrane Biotechnology Research Institute ; Cornell B, Braach-Maksyvtis V, King L, Osman P, Raguse B, Wiczorek L, og Pace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997,387, 580). I denne teknologien, er assosiasjonen av vWF, eller fragment derav og et polypeptid (f.eks. et polypeptid representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 1 til 15,20 til 34,38 til 45 og 62 til 65) koplet til lukkingen av gramacidin-fasiliterede ionkanaler i suspendert membranbilag og således til en målbar endring i ledningsevnen (tilsvarende til impedansen) til biosensoren. Denne tilnærmingen er lineær over tre størrelsesordener av ledningsevneendring og er ideelt tilpasset for storskala, høy gjennomstrømnings screening av småmolekylære kombinatoriske biblioteker. En 10% eller større endring (økning eller reduksjon) i ledningsevne i en prøve som inneholder en kandidatmodulator, relativt til ledningsevnen i en prøve som mangler kandidatmodulatoren, indikerer at kandidatmodulatoren inhiberer samvirkningen av vWF, eller fragment derav og nevnte polypeptid. Det er viktig å notere seg at i analyser som tester samvirkningen av vWF, eller fragment derav med et polypeptid (slik som for eksempel, et polypeptid representert ved et hvilket som helst SEQ ID nr: 1 til 15,20 til 34,38 til 45 og 62 til 65),

er det mulig at en modulator av samvirkningen ikke nødvendigvis samvirker direkte med domenet (ene) i proteinene som fysisk samvirker med nevnte polypeptid. Det er også mulig at en modulator vil samvirke på et sted som er borte fra setet for samvirkning og forårsaker, for eksempel, en konformasjonsendring i vWF. Modulatorer (inhibitorer eller agonister) som virker på denne måten er likevel av interesse som midler for modulerer av blodplate-mediert aggregering. Naturligvis kan fremgangsmåten ovenfor enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

En hvilken som helst beskrevet bindingsanalyse kan bli benyttet for å bestemme nærværet av et middel i en prøve, f.eks. , en vevsprøve, som binder til vWF, eller fragment derav, eller som påvirker bindingen av, for eksempel, et polypeptid representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 1 til 15, 20 til 34, 38 til 45 eller 62 til 65 til vWF. For å gjøre så, blir vWF, eller fragment derav reagert med nevnte polypeptid i nærvær eller fravær av prøven, og polypeptidbindingen blir målt på passende måte for den benyttede bindingsanalysen. En reduksjon på 10% eller mer i bindingen av nevnte polypeptid indikerer at prøven inneholder et middel som modulerer bindingen av nevnte polypeptid til vWF, eller fragment derav. Naturligvis, kan den ovenfor generaliserte fremgangsmåten enkelt bli benyttet for screening for kandidatmodulatorer som endrer bindingen mellom polypeptidkonstruktene beskrevet heri, og makromolekyler som er involvert i blodplate-mediert aggregering slik som, for eksempel, vWF, gplb eller collagen, eller et fragment derav.

25

Celler

En celle som er nyttig ifølge foreliggende oppfinnelse blir fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av bakterielle celler slik som, for eksempel, E. coli, gjærceller slik som, for eksempel, S. cerevisiae, P. pastors, insektceller eller pattedyrceller.

30

En celle som er nyttig ifølge foreliggende oppfinnelse kan være en hvilken som helst celle inn i hvilken en nukleinsyresekvens som koder for et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse kan ble introdusert slik at polypeptidet blir uttrykt ved naturlige nivåer eller mer enn naturlige nivåer, som definert heri. Foretrukket utviser et polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse som blir uttrykt i en celle, normal eller nær

35

normal farmakologi, som definert heri. Mest foretrukket er et polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse som blir uttrykt i en celle som omfatter nukleotidsekvensen som er i stand til å kode for aminosyresekvensene presentert i Tabell 30 eller i stand til å kode for en aminosyresekvens som er i det minste 70% identisk med

5 aminosyresekvensen angitt i Tabell 30.

Ifølge en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, er en celle valgt blant gruppen bestående av COS7-celler, en CHO celle, en LM (TK-) celle, en NIH-3T3 celle, HEK-293 celle, K- 562 celle eller en 1321N1 astrocytoma celle, men også andre

10 transfektable cellelinjer.

Generelt betyr "terapeutisk effektiv mengde", "terapeutisk effektive dose" og "effektiv mengde" mengden som er nødvendig for å oppnå det ønskede resultat eller resultater (behandling eller forhindring av blodplateaggregering). Fagmannen vil forstå at kraften, og derfor, en "effektiv mengde" kan variere for de forskjellige forbindelsene som

15 inhiberer blodplatedmediert aggregering benyttet i foreliggende oppfinnelse. Fagmannen kan enkelt bestemme kraften til forbindelsen.

Som benyttet heri, refererer termen "forbindelse" til polypeptidkonstruktene beskrevet heri, eller en nukleinsyre som koder for nevnte polypeptid, eller et middel identifisert ifølge screeningfremgangsmåtene beskrevet heri eller nevnte polypeptid omfattende et eller flere deprivatiserte aminosyrer.

20

Ved "farmasøytisk akseptabel" er det ment et materiale som ikke er biologisk eller på annen måte uønsket, dvs. materialet kan bli administrert til et individ sammen med forbindelsen uten å forårsake noen uønskede biologiske effekter eller samvirkninger på en skadelig måte, med en hvilken som helst de andre komponentene i den farmasøytiske sammensetningen i hvilken den er inneholdt.

25

Foreliggende oppfinnelse beskrevet heri er nyttig for behandling eller forhindring av en betingelse av blodplatedmediert aggregering, i et individ og omfatter administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse eller sammensetning som inhiberer BTK og som inhiberer blodplate-mediert aggregering.

30

Foreliggende oppfinnelse beskrevet heri er nyttig for behandling eller forhindring av de

35

første trinnene av trombusdannelse, i et individ og omfatter administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse eller sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse.

- 5 Foreliggende oppfinnelse beskrevet heri er nyttig for behandling eller forhindring restenose, i et individ og omfatter administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse eller sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse.

10 Ett aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse for behandling eller forhindring av en betingelse av blodplate-mediert aggregering, i et individ og omfatter administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse i kombinasjon med en annen, slik som, for eksempel, Aspirin.

15 Ett aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse for behandling eller forhindring av en betingelse ved blodplate-mediert aggregering, i et individ og omfatter administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse i kombinasjon med en annen, slik som, for eksempel, a trombolytisk middel.

20

Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse er en anvendelse av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse for behandling eller forhindring av plakk eller trombus i et individ. Nevnte plakk- eller trombusdannelse kan være under betingelser med høy skjær. I både trombose og reokklusjon, er den reversible adhesjonen eller bindingen av blodplater ved høy skjærrate fulgt av en sterk adhesjon gjennom kollagenreseptoren på blodplater resulterende i blodplateaktivering; bindingen av blodplater ved vWF til kollagen som er eksponert i den skadede karveggen er spesielt viktig under høy-skjær betingelser. Oppfinnerne har funnet at polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse uventet ga gode resultater under høy-skjær betingelser (for eksempel Eksempel 16.)

25

30

Foreliggende oppfinnelse is ikke begrenset til administrasjonen av formuleringer omfattende en enkel forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse. Det er innen rammen av foreliggende oppfinnelse å fremskaffe kombinasjonsbehandlinger hvor en formulering blir administrert til en pasient med behov derav som omfatter mer enn en

35

forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse.

Betingelser av blodplate-mediert aggregering omfatter, men er ikke begrenset til, ustabil angina, stabil angina, angina pectoris, embolis dannelse, dyp vene trombose, hemolytisk uremisk syndrom, hemolytisk anemi, akutt nyresvikt, trombolytiske komplikasjoner, trombotisk trombocytopenisk purpura, disseminert intravascular comgelopati, trombose, koronar hjertesykdom, tromboemboliske komplikasjoner, myocardial infarkt, restenose, andatrial trombosedannelse i atriell fibrillering, kronisk ustabil angina, transiente iskemiske atakker og slag, perifere vaskulære sykdommer, arteriell trombose, pre-eklampsi, embolisme, restenose og/eller trombose etter angioplasti, carotid endarterectomi, anastomose av vaskulære transplantater, og kronisk eksponering for kardiovaskulære anordninger. Slike betingelser kan også komme av tromboembolisme og reokklusjon under og etter trombolytisk terapi, etter angioplasti, og etter coronar arterie bypass.

15

Det er vel kjent i teknikken hvordan man skal bestemme inhiberingen av blodplate-mediert aggregering ved bruk av standardtestene beskrevet heri, eller ved bruk av andre tilsvarende tester. Fortrinnsvis skal fremgangsmåten resultere i minst en 10% reduksjon i blodplate-mediert aggregering, inkludert, for eksempel, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, eller en hvilken som helst reduksjon mellom, mer foretrukket med 90%.

20

Tilsvarende vil fremgangsmåten resultere i minst en 10% reduksjon i intracellulær kalsiummobilisering, inkludert, for eksempel, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%. Tilsvarende vil fremgangsmåten resultere i minst en 10% reduksjon i nivået av fosforylert PLC γ 2 inkludert, for eksempel, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

25

Reduksjonen kan bli målt, for eksempel, ved sammenligning av den optiske impedansen i et kronologi blodplate aggregometer. En hvilken som helst annen kjent fremgangsmåte for måling kan også bli benyttet. For eksempel, (1) etter collagenstimulering øker nivået av collagen-indusert intracellulær kalsiummobilisering over tid og således kan målingen inkludere måling av nivået av collagen-indusert intracellulær kalsium eller (2) etter collagenstimulering øker nivået av fosforylert PLC γ 2 over tid og således kan målingen inkludere måling av nivået av fosforylert PLC γ 2.

30

35

Cellene kan bli kontaktet in vitro, for eksempel, ved tilsetning av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse til kulturmediet (ved kontinuerlig infusjon, ved boluslevering, eller endring av mediet til et medium som inneholder forbindelsen) eller ved tilsetning av forbindelsen til det ekstracellulære fluidet in vivo (ved lokal levering, systemisk levering, inhalasjon, intravenøs injeksjon, boluslevering, eller kontinuerlig infusjon). Varigheten av "kontakten" med en celle eller en populasjon av celler blir bestemt ved tiden forbindelsen er til stede ved de fysiologisk effektive nivåene eller ved antatt fysiologisk effektive nivåer i mediet eller ekstracellulært fluid som omgir cellen eller cellene.

Fortrinnsvis er kontakttiden 1-96 timer, og mer foretrukket 24 timer, men en slik tid vil variere basert på halveringstiden til forbindelsen og kan bli optimalisert av fagmannen ved bruk av rutineeksperimenter.

Forbindelsen som er nyttige i foreliggende oppfinnelse kan bli formulert som farmasøytisk sammensetnings og administrert til en pattedyrvert, slik som en human pasient eller et husdyr i forskjellige former tilpasset til den valgte administrasjonsveien, dvs. oralt eller parenteralt, eller intra-nasalt ved inhalasjon, intravenøst, intramuskulært, topikalt eller subkutant.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli administrert ved bruk av genterapi-fremgangsmåter for levering. Se, f.eks., U. S. Patent Nr. 5,399, 346. Ved bruk av en genterapi-fremgangsmåte for levering, kan primære celler transfektert med genet for forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse i tillegg bli transfektert med vevsspesifikke promoterer overfor målspesifikke organer, vev, implantater, tumorer, eller celler.

Således kan foreliggende forbindelse bli administrert systemisk, f.eks., oralt, i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer slik som en inert fortyner eller en assimilerbar spiselig bærer. De kan også være innesluttet i gelatinkapsler med harde eller myke skall, kan være presset til tabletter, eller kan bli inkorporert direkte i maten i pasientens diett. For oral terapeutisk administrasjon, kan den aktive forbindelsen være kombinert med en eller flere eksipienter og benyttet i form av spiselige tabletter, buccale tabletter, trocheer, kapsler, eliksirer, suspensjoner, siruper, oblater, og

liknende. Slike sammensetninger og fremstillinger må inneholde minst 0,1% aktiv forbindelse. Prosentdelene i sammensetningene og fremstillingene kan, naturligvis, bli variert og kan hensiktsmessig være mellom omkring 2 til omkring 60% av vekten av en gitt doseringsform. Mengden av aktiv forbindelse i slike terapeutisk nyttige sammensetninger er slik at et effektivt doseringsnivå vil bli fremskaffet.

Tablettene, trocheene, pillene, kapslene, og liknende kan også inneholde det følgende: bindemidler slik som gum tragacant, acacia, maisstivelse eller gelatin ; eksipienter slik som di kalsiumfosfat; et disintegreringsmiddel slik som maisstivelse, potetstivelse, alginsyre og liknende ; et smøremiddel slik som magnesiumstearat; og et søtningsmiddel slik som sukrose, fruktose, laktose eller aspartam eller smaksmiddel slik som peppermynte, vintergrønnolje eller kirsebærsmak, bli tilsatt. Når enhetsdoseringsformen er en kapsel, kan den inneholde, i tillegg til materialer av den ovenfor nevnte type, en flytende bærer, slik som et vegetabilisk olje eller et polyetylenglykol.

Forskjellige andre materialer kan være til stede, som belegging eller på annen måte modifierer den fysiske formen av den faste enhetsdoseringsformen. For eksempel, kan tablett, piller, eller kapsler være belagt gelatin, voks, shellac eller sukker og liknende. En sirup eller eliksir kan inneholde den aktive forbindelsen, sukrose eller fruktose som et søtningsmiddel, metyl- og propylparabener som konserveringsmidler, et fargestoff og smaksstoffer slik som kirsebær- eller appelsinsmak. Naturligvis må et hvert materiale som blir benyttet i fremstillingen av en hvilken som helst enhetsdoseringsform, være farmasøytisk akseptabel og hovedsakelig ikke-toksiske i de benyttede mengdene. I tillegg, kan den aktive forbindelsen være inkorporert i preparater og anordninger for vedvarende frigiving.

Den aktive forbindelsen kan også bli administrert intravenøst eller intraperitonealt ved infusjon eller injeksjon. Oppløsninger av den aktive forbindelsen eller dets salter kan bli preparert i vann, eventuelt blandet med et ikke-toksisk overflateaktivt middel. Dispersjoner kan også bli preparert i glyserol, flytende polyetylenglykoler, triacetin, og blandinger derav og i oljer. Under ordinære betingelser for lagring og anvendelse, inneholder disse preparatene et konserveringsmiddel for å forhindre vekst av mikroorganismer.

35

- De farmasøytiske doseringsformene som passer for injeksjon eller infusjon kan inkludere sterile vandige løsninger, dispersjoner eller sterile pulvere omfattende den aktive ingrediens som er tilpasset for ekstemperert fremstilling av sterile injiserbare eller infusserbare oppløsninger eller dispersjoner, eventuelt innkapslet i liposomer. I
- 5 alle tilfeller må den endelige doseringsform være steril, flytende og stabil under betingelsene ved fremstilling og lagring. Den flytende bæreren eller vehikkelen kan være et løsemiddel eller et flytende dispersjonsmedium omfattende, for eksempel, vann, etanol, en polyol (for eksempel, glycerol, propylenglycol, flytende
- 10 polyetylen glycoler, og liknende), vegetabiliske oljer, ikke-toksiske glycerylestere, og passende blandinger derav. Den passende fluiditet kan bli opprettholdt, for eksempel, ved dannelsen av liposomer, ved opprettholdelse av den ønskede partikkelstørrelsen for dispersjoner eller anvendelsen av surfaktanter. Forhindringen av virkningen av mikroorganismer kan bli virkeliggjort ved forskjellige antibakterielle og antifungale midler, for eksempel, parabener, klorobutanol, fenol, sorbinsyre, timerosal, og liknende.
- 15 I mange tilfeller vil det være foretrukket å inkludere isotoniske midler, for eksempel, sukker, buffere eller natriumklorid. Forlenget absorpsjon av de injiserbare sammensetningene kan bli virkeliggjort ved anvendelsen i sammensetningene av midler for forsinking av absorpsjon, for eksempel, aluminiummonostearat og gelatin.
- 20 Sterile injiserbare oppløsninger blir fremstilt ved innlemming av den aktive forbindelsen i den påkrevde mengden i et passende løsemiddel med forskjellige av de andre ingrediensene ovenfor, etter behov, fulgt av sterilfiltrering. For sterile pulvere for fremstillingen av sterile injiserbare oppløsninger, er foretrukne fremgangsmåter for fremstilling vacuumtørkings- og frysetørkingsteknikker, som gir et pulver av den aktive
- 25 ingrediensen pluss eventuelle andre ønskede ingredienser som er til stede i den tidligere sterilfiltrerte oppløsningen.

- For topical administrasjon, kan foreliggende forbindelse bli benyttet i ren form, dvs. , når de er væsker. Imidlertid, vil det generelt være ønskelig å administrere dem på
- 30 huden som sammensetninger eller formuleringer, i kombinasjon med en dermatologisk akseptabel bærer, som kan være et faststoff eller en væske.

- Nyttige faste bærere inkluderer findelte faststoff slik som talk, leire, mikrokrystallinsk cellulose, silica, alumina og liknende. Nyttige væskebærere inkluderer vann,
- 35 hydroksyalkyler eller glykoler eller vann-alkohol/glykol-blandinger, i hvilke foreliggende

forbindelse kan være oppløst eller dispergert ved effektive nivåer, eventuelt ved hjelp av ikke-toksiske surfaktanter. Adjuvanter slik som duft og ytterligere antimikrobielle midler kan bli tilsatt for å optimalisere egenskapene for en gitt anvendelse.

- 5 De resulterende væskesammensetningene kan bli påført fra absorberende puter, bli benyttet for å impregnere bandasjer og andre forbindelser, eller sprayet på det påvirkede området ved bruk av pump-type eller aerosol sprayer.

- 10 Fortykkere, slik som syntetiske polymerer, fettsyrer, fettsyresalter og estere, fett alkoholer, modifiserte celluloser eller modifisert mineralmaterialer kan også bli benyttet med flytende bærere for å danne smørbare pastaer, geler, salver, såper, og liknende, for påføring direkte på huden til brukeren.

- 15 Eksempler på nyttige dermatologiske sammensetninger som kan bli benyttet for levering av forbindelsen til huden er kjent i teknikken; for eksempel, se Jacquet et.al. (U. S. Pat. Nr. 4,608, 392), Geria (U. S. Pat. No. 4,992, 478), Smith et al. (U. S. Pat. Nr. 4,559, 157) og Wortzman (U. S. Pat. Nr. 4,820, 508).

- 20 Nyttige doseringer av forbindelsen kan bli bestemt ved sammenligning av deres in vitro aktivitet, og in vivo aktivitet i dyremodeller. Fremgangsmåter for ekstrapoleringen av effektive doseringer i mus, og andre dyr, til mennesker, er kjent i teknikken, se U. S. Pat. Nr. 4,938, 949.

- 25 Generelt vil konsentrasjonen av forbindelsen (ene) i en væskesammensetning, slik som en hudkrem, være fra omkring 0.1-25 vekt%, foretrukket fra omkring 0.5-10 vekt%. Konsentrasjonen i en halvfast eller fast sammensetning slik som en gel eller et pulver, vil være omkring 0.1-5 vekt%, foretrukket omkring 0.5-2.5 vekt%.

- 30 Mengden av forbindelsen, eller et aktivt salt eller derivat derav, som er nødvendig for anvendelse i behandlingen vil variere ikke kun med det bestemte valgte saltet, men også administrasjonsveien, naturen til betingelsen som blir behandlet og alderen og tilstanden til pasienten og vil til sist bli bestemt av ansvarlig lege eller kliniker. Doseringen av forbindelsen varierer også avhengig av målcellen, -tumoren, -vevet, -implantatet eller -organet.

Den ønskede dosen kan hensiktsmessig være til stede i en enkel dose eller som oppdelte doser administrert ved passende intervaller, for eksempel, som to, tre, fire eller flere snusdåser per dag. SUB dosen kan i seg selv være videre delt, f.eks. i et antall separate løselig oppdelte administrasjoner, slik som multiple inhalasjoner fra en
5 pusteanordning eller ved tilførsel av et flertall dråper i øyet.

Et administrasjonsregime kan inkludere langtids, daglig behandling. Ved "langtids" er det ment to uker og foretrukket flere uker, måneder eller års varighet. Nødvendige modifikasjoner i dette doseringsområdet kan bli bestemt av fagmannen kun ved bruk
10 av rutineeksperimenter gitt læren heri. Se Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W. , ed. 4), Mack Publishing Co. , Easton, PA. Doseringen kan også bli justert av den individuelle legen i fall noen komplikasjoner.

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer et middel som er en modulator for blodplate-
15 mediert aggregering.

Kandidatmiddelet kan være et syntetisk middel, eller en blanding av midler, eller kan være et naturlig produkt (f.eks. et planteekstrakt eller kultursupernatant). Et kandidatmiddel ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer små molekyler som kan være
20 syntetisert, et naturlig ekstrakt, peptider, proteiner, karbohydrater, lipider etc.

Kandidat modulatormidler fra store biblioteker av syntetiske eller naturlige midler kan bli screenet. Tallrike midler blir i dag benyttet for tilfeldig og rettet syntese av sakkariid-, peptid-, og nukleinsyrebaserte midler. Syntetiske middelbiblioteker er kommersielt
25 tilgjengelig fra et antall firma inkludert Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), og Microsource (New Milford, CT). Et fortreffelig kjemisk bibliotek er tilgjengelig fra Aldrich (Milwaukee, WI). Kombinatoriske biblioteker er tilgjengelige og kan bli fremstilt. Alternativt, er biblioteker av naturlige midler i form av bakterielle, fungale, plante og
30 animalske ekstrakter tilgjengelige fra f.eks., Pan Laboratories (Bothell, WA) eller MycoSearch (NC), eller er lett produserbare ved fremgangsmåter som er velkjente i teknikken. I tillegg, blir naturlige og syntetisk produserte biblioteker og midler lett modifisert ved konvensjonelle kjemiske, fysikalske og biokjemiske midler.

35 Nyttige midler kan bli funnet innen tallrike kjemiske klasser. Nyttige midler kan være

organiske forbindelser, eller små organiske forbindelser. Små organiske midler har en molekylvekt på mer enn 50, men mindre enn omkring 2,500 dalton, foretrukket mindre enn omkring 750, mer foretrukket mindre enn omkring 350 dalton. Eksempler på klasser inkluderer heterocycler, peptider, sakkarider, steroider, og liknende. Midlene kan være modifisert øke effektivitet, stabilitet, farmasøytisk kompatibilitet, og liknende. Strukturell identifikasjon av et middel kan bli benyttet for å identifisere, generere, eller screene for ytterligere midler. For eksempel, hvor peptidmidler er identifisert, kan de bli modifisert på forskjellige måter for å øke deres stabilitet, slik som ved bruk av en unaturlig aminosyre, slik som en D-aminosyre, spesielt D-alanin, by funksjonalisering av amino- eller karboksy-terminalen, f.eks. for aminogruppen, acylering eller alkylering, og for karboksylgruppen, esterifisering eller amidifisering, eller liknende.

For primær screening, er en anvendelig konsentrasjon av et kandidatmiddel ifølge foreliggende oppfinnelse fra omkring 10 mM til omkring 100 μ M eller mer (dvs. 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M etc.). Den primære screeningkonsentrasjonen vil bli benyttet som en øvre grense, sammen med ni ytterligere konsentrasjoner, hvor de ytterligere konsentrasjonene bli bestemt ved reduksjon av den primære screeningkonsentrasjonen med halv-logaritmiske intervaller (f.eks. for 9 flere konsentrasjoner) for sekundære screeninger eller for generering av konsentrasjonskurver.

Høygjennomløps screening sett

Et høygjennomløps screeningsett ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter alle de nødvendige midler og medier for utførelse av deteksjonen av et middel som modulerer blodplate-mediert aggregering ved samvirkning med et mål ifølge foreliggende oppfinnelse, slik som for eksempel vWF, eller fragment derav i nærvær av et polypeptid (for eksempel, et polypeptid representert ved SEQ ID nr: 1 til 15, 20 til 34, 38 til 45, 62 til 65 eller et polypeptidkonstrukt), foretrukket ved en konsentrasjon i området fra 1 μ M til 1 mM. Settet omfatter det følgende. Rekombinante celler ifølge foreliggende oppfinnelse, omfattende og uttrykkende nukleotidsekvensen som koder for vWF, eller fragment derav, som blir dyrket ifølge settet på en faststoff støtte, slik som en mikrotiterplate, mer foretrukket en 96 brønners mikrotiterplate, ifølge fremgangsmåter som er velkjent for fagmannen, spesielt som beskrevet i WO 00/02045. Alternativt blir vWF, eller fragment derav levert i en renset form for immobilisering på, for eksempel, en 96 brønners mikrotiterplate av en fagmann. Alternativt blir vWF, eller fragment derav

- levert i settet pre-immobilisert på, for eksempel, en 96 brønners mikrotiterplate. Alternativt, i tilfeller hvor makromolekylet som skal screenes mot er gplb, gpla/IIa, eller collagen, vil utførelsesformene ovenfor bære gplb, gpla/IIa, eller collagen polypeptid eller henholdsvis polynukleinsyre i stedet for vWF. Sett kan inneholde mer enn ett
- 5 makromolekyl (f.eks. vWF, gplb eller collagen makromolekyl og/eller polynukleinsyre). Modulatormidler ifølge foreliggende oppfinnelse, ved konsentrasjoner fra omkring 1 μM til 1 mM eller more, blir tilsatt til definerte brønner i nærvær av en passende konsentrasjon av polypeptidkonstrukt hvor nevnte konsentrasjon av polypeptid fortrinnsvis er i området fra 1 μM til 1 mM. Settet kan inneholde mer enn ett polypeptid.
- 10
- Bindingsanalyser ble utført ifølge fremgangsmåtene som allerede er beskrevet heri og resultatene sammenlignet med basisnivåene for, for eksempel vWF, eller fragment derav for binding til et polypeptid, slik som, for eksempel, et polypeptid representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 2 til 15, 20 til 34, 38 til 45 eller 62 til 65, men i fravær av
- 15 tilsatt modulatormiddel. Brønner som viser minst 2 ganger, foretrukket 5 ganger, mer foretrukket 10 ganger og mest foretrukket en 100 ganger eller mer økning eller reduksjon i vWF-polypeptid-binding (for eksempel) sammenlignet med nivået til aktiviteten i fravær av modulator, ble valgt for videre analyse.
- 20 **Andre nyttige sett ifølge foreliggende oppfinnelse**
- Foreliggende oppfinnelse fremskaffer sett som er nyttige for screening for modulatorer av blodplate-mediert aggregering, så vel som sett som er nyttige for diagnose av sykdommer eller forstyrrelser som er karakterisert ved dysregulering av blodplate-mediert aggregering. Sett som er nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse kan inkludere
- 25 et isolert vWF, eller fragment derav. Alternativt, eller i tillegg, kan et sett omfatte celler som er transformert for å uttrykke vWF, eller fragment derav. I en ytterligere utførelsesform, kan et sett ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte et polynukleotid som koder for vWF, eller fragment derav.
- 30 I en ytterligere utførelsesform, kan et sett ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte de spesifikke primerne som er nyttige for amplifikasjon av vWF, eller fragment derav. Alternativt, i tilfeller hvor makromolekylet som skal bli screenet mot er gplb, eller collagen, vil utførelsesformene ovenfor bære henholdsvis gplb, gpla/IIa, eller collagen polypeptid eller polynukleinsyre, eller fragment derav i stedet for vWF. Sett kan
- 35 inneholde mer enn ett makromolekyl (f.eks. vWF, gplb, eller collagen makromolekyl

eller polynukleinsyre, eller fragment derav). Sett som er nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte et isolert polypeptid representert ved en hvilken som helst SEQ ID nr: 1 til 15, 20 til 47 eller 62 til 65, en homolog derav, eller en funksjonell del derav, eller et polypeptidkonstrukt ifølge foreliggende oppfinnelse. Et sett ifølge

5 foreliggende oppfinnelse kan omfatte celler som er transformert til å uttrykke nevnte polypeptid. Sett kan inneholde mer enn ett polypeptid. Ifølge en ytterligere utførelsesform, kan et sett ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte et polynukleotid som koder for et makromolekyl, for eksempel, vWF, gplb, eller collagen, eller fragment derav. Ifølge enda en ytterligere utførelsesform, kan et sett ifølge foreliggende

10 oppfinnelse omfatte de spesifikke primerne som er nyttige for amplifikasjon av et makromolekyl slik som, for eksempel, vWFGplb, eller collagen, eller fragment derav. Alle sett ifølge foreliggende oppfinnelse vil omfatte de angitte trekk eller kombinasjoner av trekk og pakkematerialer for disse. Sett vil også omfatte bruksanvisninger.

15 **Medisinske anordninger**

Det blir også beskrevet evasive medisinske anordninger belagt med et polypeptidkonstrukt som beskrevet heri eller et middel som er resultat av en screeningfremgangsmåte som beskrevet heri for anvendelse i anordninger som krever dette. Ikke-begrensede eksempler på anordninger omfatter kirurgiske rør og slanger,

20 okklusjonsanordninger, proteseanordninger. Anvendelsen av nevnte anordninger omfatter kirurgiske prosedyrer som krever en modulering av blodplate-mediert aggregering omkring invasjonsstedet.

En utførelsesform beskrevet heri er en fremgangsmåte for behandling av invasive

25 medisinske anordninger for å forhindre blodplate-mediert aggregering omkring invasjonsstedet omfattende trinnet ved belegging av nevnte anordning med et polypeptidkonstrukt eller middel ifølge foreliggende oppfinnelse.

En annen utførelsesform beskrevet heri er invasive medisinske anordninger som

30 unngår blodplatedmediert aggregering omkring invasjonsstedet, hvor nevnte anordning er belagt med et polypeptidkonstrukt eller -middel ifølge foreliggende oppfinnelse.

EKSEMPLER

Foreliggende oppfinnelse er illustrert med de følgende ikke-begrensede eksemplene.

Oversikt over eksempler

Eksempel 1. Immunisering av lama002

Eksempel 2. Repertoarkloning

Eksempel 3. Gjenvinning av biblioteket, fagfremstilling

5

Seleksjon for bindere for vWF inhibering av samvirkningen med collagen:

Eksempel 4. Seleksjon for binder for vWF inhibering av samvirkning med collagen første og andre runde av panorering

10 Eksempel 5. Funksjonell karakterisering av vWF bindere. Inhibering av binding av vWF til collagen ved VHH

Eksempel 6. Ekspresjon og rensing av VHH

Eksempel 7. ELISA-binding til vWF

Eksempel 8. Spesifisitet til VHHs

Eksempel 9. Inhibering ELISA med renset VHH

15 Eksempel 10. Sekvensering av klonene

Eksempel 11. Epitopmapping

Eksempel 12. Bivalent og bispesifik VHHs-ekspresjon og rensing

Eksempel 13. Binding i ELISA til vWF

Eksempel 14. Inhibering ELISA med renset VHH

20 Eksempel 15. Stabilitet til bivalente eller bi-spesifikke konstrukter i human plasma

Eksempel 16. Evaluer inhibering av VHH ved høy skjær.

Seleksjon av bindere for vWF inhibering av samvirkningen med blodplater :

25 Eksempel 17. Seleksjon av bindere for vWF inhiberer v samvirkningen med blodplatepanorering

Eksempel 18. Screening for binding til A1-domenet av vWF

Eksempel 19. Seleksjon av bindere for vWF som inhiberer samvirkningen med blodplater MATCHM

Eksempel 20.ELISA-binding til vWF av renset VHH

30 Eksempel 21. Inhiberings-ELISA med renset VHH

Eksempel 22. Sekvensering av klonene

Eksempel 23. Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Eksempel 24. Bivalent VHHs ekspresjon og rensing

Eksempel 25. Evaluere inhibering av VHH ved høy skjær.

35

Fremstilling av bi-spesifikke konstrukter for vWF-spesifikk VHH:

Eksempel 26. Konstruksjon og sekvens til bi-spesifikke konstrukter

Eksempel 27. Ekspresjon og rensing av bi-spesifikke konstrukter

Eksempel 28. Binding til vWF

- 5 Eksempel 29. Inhibering av binding av vWF til collagen av de bi-spesifikke konstruktene sammenlignet med de monovalente VHHs

Eksempel 30. Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Screening for bindere for collagen type I og type III :

- 10 Eksempel 31. Seleksjon av bindere for collagen type I

Eksempel 32. Test VHH i ELISA for binding til collagen type I og type III.

Eksempel 33. Sekvensering av klonene

Eksempel 34. Binding av rensset VHH til collagen type I og type III

- 15 Eksempel 35. Seleksjon av bindere for collagen type I som inhiberer samvirkningen med vWF

Eksempel 36. Test VHH i ELISA for binding til collagen type I og type III.

Eksempel 37. Sekvensering av klonene

Eksempel 38. Binding av rensset VHH til collagen type I og type III

- 20 Eksempel 39. Test for inhibering av binding av vWF til collagen ved collagen-spesifikk VHH i ELISA

Eksempel 40. Test av inhibering av blodplateaggregering ved collagen-spesifikk VHH ved lav og ved høy skjær

Forbedret halveringstid for VHH:

- 25 Eksempel 41. Immunisering av lama

Eksempel 42. Repertoarkloning

Eksempel 43. Gjenvinning av biblioteket, fagfremstilling

Eksempel 44. Fag ELISA

Eksempel 45. Seleksjon av første og andre runde av biopanoering

- 30 Eksempel 46. Screening av individuelle kloner etter biopanoering

Eksempel 47. Hinfl-mønster og sekvensering

Eksempel 48. Test av kryss-reaktivitet med albumin for forskjellige arter

Eksempel 49. Ekspresjon og rensing

Eksempel 50. ELISA på MSA til de rensede nanobodies

- 35 Eksempel 51. Konstruksjon og sekvens til bi-spesifikke konstrukter

Eksempel 52. Ekspresjon og rensing av bi-spesifikke konstrukter

Eksempel 53. Funksjonalitet til begge VHHs i de bi-spesifikke konstruktene

Eksempel 54. Inhibering av binding av vWF til collagen ved de bispesifik konstrukts sammenlignet med de monovalente VHHs

5

Seleksjon av bindere for gplb som inhiberer samvirkningen med vWF:

Eksempel 55. Seleksjon av bindere for rgplb

Eksempel 56. Screening for bindere i ELISA.

Eksempel 57. Binding av rensset VHH til rgplb

10 Eksempel 58. Sekvensering av klonene

Eksempel 59. Test inhibitoriske egenskaper til VHHs som er spesifikke for gplb

Eksempel 60. Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Belegging av stenter, slanger og rør, ballonger, katetre, transplantasjonsmateriale med

15 VHH:

Eksempel 61. Stabilitet av VHH

Eksempel 62. VHH immobilisert i en polymer

Humanisering av C37:

20 Eksempel 63. Innretting av C37 med DP-47

Eksempel 64. Mutagenese av C37

Fragmenter av anti-VWF VHHs

Eksempel 65. Ekspresjon av et VHH-CDR3 fragment av vWF-C37

25 Eksempel 66. Seleksjon av en første og andre runde av biopaneroring på rekombinant A1(rA1)

Eksempel 67. Screening av individuelle kloner etter biopaneroring

Eksempel 68. Hinfli-mønster og sekvensering

Eksempel 69. Inhiberings-ELISA

30

Eksempler

Eksempel 1: Immunisering av lama002

En lama ble immunisert med en blanding av vWF og collagen type I og type III. De antigenene er alle involvert i dem første samvirkningen som fører til

35 blodplateaggregering (Figur 1). Immuniseringsskjemaet er oppsummert i Tabell 1

Eksempel 2: Repertoarkloning

- Perifere blodlymfocytter (PBLs) ble isolert ved sentrifugering på en tetthetsgradient (Ficoll-Paque Plus Amersham Biosciences). PBLs ble benyttet for å ekstrahere totalt RNA (Chomczynski og Sacchi 1987). cDNA ble preparert på 100 µg totalt RNA med MMLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL) ved bruk av oligo d(T) oligonukleotider. cDNA ble rensset ved en fenol/kloroform ekstraksjon, fulgt av en etanolutfelling og ble deretter benyttet som templat for å amplifisere VHH repertoaret.
- I en første PCR, ble repertoaret av både konvensjonelle (1.6 kb) og tungkjede (1.3 kb) antistoff gensegmenter amplifisert ved bruk av en leaderspesifikk primer(5' GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT-3') (SEQ ID Nr. 66) og oligo d(T) primeren (5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') (SEQ ID Nr. 66). De resulterende DNA-fragmentene ble separert ved agarose gelelektroforese og 1.3 kb fragmentet, som koder for tungkjede antistoff segment ble rensset fra agarosegelen. En andre PCR ble utført ved bruk av en blanding av FR1 revers primere og den samme oligo d(T) forward primeren. PCR-produktene ble kuttet med Sfil (introdusert i FR1 primeren) og BstEII (naturlig forekommende i FR4). Etter gelelektroforese, ble DNA-fragmentet på omkring 400 basepar rensset fra gelen og ligert inn i de tilsvarende restriksjonssetene til fagemid pAX004 for å oppnå et bibliotek av klonede VHHs etter elektroporasjon av Escherichia coli TG1. Størrelsen av biblioteket var 1.4×10^7 cfu, og alle klonene inneholdt inserter med den korrekte størrelsen.

Eksempel 3: Gjenvinning av biblioteket, fagfremstilling

- Biblioteket ble dyrket ved 37 °C i 10 ml 2xTY medium inneholdende 2% glukose, og 100 µg/ml ampicillin, inntil OD 600 nm kom opp i 0.5. M13KO7 fag (1012) ble tilsatt og blandingen ble inkubert ved 37 °C i 2 x 30 minutter, først uten risting, så med risting ved 100 RPM. Celler ble sentrifugert i 10 minutter ved 4500 RPM ved romtemperatur. Den bakterielle pelleten ble resuspendert i 50 ml 2xTY medium inneholdende 100 µg/ml ampicillin og 25µg/ml kanamycin, og inkubert over natten ved 37 °C med kraftig risting ved 250 RPM. De overnattede kulturene ble sentrifugert i 15 minutter ved 10000 RPM ved 4 °C. Fag ble PEG presipitert (20% poly-etylen-glykol og 1.5 M NaCl) og sentrifugert i 30 minutter ved 10000 RPM. Pelleten ble resuspendert i 20 ml PBS. Fag ble igjen PEG-presipitert og sentrifugert i 30 minutter ved 20000 RPM og 4 C. Pelleten ble oppløst i 5 ml PBS-1% kasein. Fag ble titrert ved infeksjon av TG1 celler ved

OD_{600nm} = 0.5 og utsåing på LB agarplater inneholdende 100 µg/ml ampicillin og 2% glukose. Antallet transformanter indikerer antallet av fag (= pfu). Fagene ble lagret ved -80 °C med 15% glyserol.

5 **Seleksjon for bindere for vWF-inhibering av samvirkningen med collagen (Figur 2)**

Eksempel 4: Seleksjon for bindere for vWF-inhibering av samvirkningen med collagen : første og andre runde av panorering

En brønn i en mikrotiterplate ble belagt med 2 µg/ml vWF eller med PBS inneholdende 10 1% kasein. Etter inkubering over natten ved 4 °C, ble brønner ble blokkert med PBS inneholdende 1 % kasein, i 3 timer ved RT. 200 µl fag ble tilsatt til brønnene. Etter 2 timer inkubering ved RT, ble brønner vasket 10x med PBS-Tween og 10x med PBS. Fag ble spesifikt eluert med 100 µl av 100 µg/ml collagen type III. Elueringer ble utført for over natten ved romtemperatur. Eluerte fag ble tillatt å infisere eksponentielt voksende TG1 celler, og ble så sådd på LB agarplater inneholdende 15 100 µg/ml ampicillin og 2% glukose. Dette eksperimentet ble gjentatt for en andre runde av panorering, under de samme betingelser som beskrevet ovenfor. Resultatene fra panoreringen er angitt i Tabell 2.

20 **Eksempel 5: Funksjonell karakterisering av vWF bindere: Inhibering av binding av vWF til collagen av VHH**

En mikrotiterplate ble belagt over natten at 4 °C med collagen type III ved 25pg/ml i PBS. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween og blokkert i 2 timer ed romtemperatur med PBS inneholdende 1 % kasein. Platen ble vasket fem ganger med 25 PBS-tween. 100 µl av 2 g/ml vWF (vWF er pre-inkubert ved 37 C i 15 minutter) ble blandet med 20 µl periplasmisk ekstrakt inneholdende et VHH antistoff (beskrevet i Eksempel 6) og inkubert i 90 minutter ved romtemperatur i brønner på mikrotiterplaten. Platen ble vasket fem ganger med PBS-tween. Et anti-vWF-HRP monoklonalt antistoff (DAKO) ble fortynnet 3,000-ganger i PBS og inkubert i 1 time. Platen ble vasket 30 30 ganger med PBS-Tween og vWF-binding ble detektert med ABTS/H₂O₂. Signaler ble målt etter 30 minutter ved 405 nm. Resultatene er presentert i Tabell 3, og viser at inhibitorer blir fremskaffet etter den første og andre runden av panorering.

Eksempel 6: Ekspresjon og rensing av VHH

Plasmid ble preparert for bindere for vWF som inhiberer samvirkningen med collagen type III og ble transformert til WK6 elektrokompetente celler. En enkel koloni som ble benyttet for å starte en over-natten kultur i LB inneholdende 2% glukose og 100 µg/ml ampicillin. This over-natten kulturen ble fortynnet 100-ganger i 300ml TB medium
5 inneholdende 100 µg/ml ampicillin, og inkubert ved 37 °C inntil OD600nm= 0.5. 1 mM IPTG ble tilsatt og kulturen ble inkubert i 3 ytterligere timer ved 37 °C eller over natten ved 28 °C.

Kulturer ble sentrifugert i 20 minutter ved 10000 RPM ved 4 °C. Pelleten ble frosset
10 over natten eller i 1 time ved -20 °C. Deretter ble pelleten tint ved romtemperatur i 40 minutter, re-suspendert i 20 ml PBS og ristet på is i 1 time. Periplasmisk fraksjon ble isolert ved sentrifugering i 20 minutter ved 4 °C ved 20000 RPM. Supernatanten inneholdende VHH ble satt på Ni-NTA og rensset til homogenisitet. Utbyttet av VHH ble beregnet ifølge ekstinksjonskoeffisienten. Resultater er oppsummert i Tabell 4.

15

Eksempel 7: ELISA: binding til vWF

En mikrotiterplate ble belagt med 2 µg/ml vWF, over natten ved 4 °C. Plater ble blokkert i to timer ved romtemperatur med 300 µl 1% kasein i PBS. Platene ble vasket tre ganger med Tween. Fortynningsserier av alle rensede prøvene ble inkubert i 2 timer
20 ved RT. Plater ble vasket seks ganger med PBS-Tween, etter hvilken binding av VHH ble detektert ved inkubering med mus anti-myc mAB 1/2000 i PBS i 1 time ved RT fulgt av anti-muse-HRP-konjugat 1/1000 i PBS, også i 1 time ved RT. Farging ble utført med substratet ABTS/H₂O₂ og signalene ble målt etter 30 minutter ved 405 nm. Bindingen som en funksjon av konsentrasjonen av rensset VHH er indikert i Figur 3.

25

Eksempel 8: Spesifisitet av VHHs

Mikrotiterplater ble belagt med 2 µg/ml vWF og 3 andre antigener som ikke er involvert i blodplateaggregering, men som også var immunisert i lama 002. ELISA ble utført som beskrevet i Eksempel 7 med 670, 67 og 6.7 nM VHH. Resultatene er oppsummert i
30 Tabell 5. Resultatene viser at de inhibitoriske VHH er spesifikke for vWF.

Eksempel 9: Inhiberings ELISA med rensset VHH

Inhiberings ELISA ble utført som beskrevet i Eksempel 5, men med avtakende konsentrasjoner av VHH og med humant plasma ved en fortynning på 1/60 i stedet for
35 med rensset vWF eller med humant uforynnet plasma. Resultater er angitt i figur 4.

Konsentrasjonen av VHH som resulterer i 50% inhibering (IC50) er gitt i Tabell 6.

Eksempel 10: Sekvensering av klonene

Kloner ble sekvensert med M13 universell revers primer. Aminosyresekvenser er vist i
5 Tabell 30 (SEQ ID nummer 1,3, 4,5, 6 og 7).

Eksempel 11: Epitopmapping

Kloning av A3 domenet av vWF i pBAD-Oprl-ss

pBAD-Oprl-strep-spec-vektoren ble benyttet for å fremvise VWF A3 domenet som en
10 fusjon med Oprl på overflaten av UT5600 E. coli-celler (F-ara-14 leuB6 azi-6 lacY1
proC14 tsx-67 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi1 DompT fepC266) (Cote-
Sierra et al, 1998, Gene, 221: 25-34). Genet som koder for A3 domenet på
vWF(201aa) ble amplifisert ved PCR ved bruk av A3for og A3back PCR primerne.

15 A3for : CTG GTG CTG CAG AGG TGA AGC TTC GGA GAG GGG CTG CAG ATC
(SEQ ID Nr. 68)

A3back: ATC CAT GCA AAT CCT CTA GAA TCC AGA GCA CAG TTT GTG GAG
(SEQ ID Nr. 69)

Fragment og vektor ble kuttet med HindIII og XbaI, ligert og transformert i UT5600
20 (=pBAD-vWFA1/pBAD-vWFA3). Transformerte celler ble utsådd på LB agarplater
inneholdende 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin.

pBAD-vWFA3 plasmidet ble transformert i UT5600F-celler og sådd på LB agarplater
med 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin. En enkel koloni ble benyttet for å
25 inokulere LB medium med 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin. Celler ble
dyrket over natten ved 37 C ved 200 RPM. Den neste dagen ble cellene indusert med
0.2% arabinose og inkubert i 1 ytterligere time ved 37 °C ved 150 RPM. Totale
cellelysater ble kokt i reduserende prøvebuffer, satt på en 12% SDS-PAGE og overført
til nitrocellulose for Western blotting.

30

Overførte proteiner ble detektert ved bruk et monoklonalt anti-Oprl antistoff (SH2.2)
(CoteSierra et al, 1998, Gene, 221: 25-34). Et anti-mus IgG konjugert med alkalisk
fosfatase ble benyttet (Sigma), og blottene ble utviklet med BCIP/NBT (Figur 5).

35 pBAD-vWF-A3 plasmidene ble transformert i UT5600F-celler og sådd på LB

agarplater med 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin. En enkel koloni ble benyttet for å inokulere LB medium med 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin. Celler ble dyrket over natten ved 37 °C ved 200 RPM. Neste dag ble cellene indusert med 0.2% arabinose og inkubert i ytterligere 1 time ved 37 °C ved 150 RPM. En mikrotiterplate ble belagt over natten ved 4 °C med det monoklonale anti-Oprl antistoffet (SH2.2) fortynnet 1/1000 i PBS og blokkert i 2 timer ved RT med PBS inneholdende 1% kasein. Etter induksjon ble totale celler tillatt å binde til platen i 1 time ved romtemperatur. Platene ble vasket fem ganger med PBS-Tween.

- 10 Fagfremstillinger av enkle kolonier ble tillatt å binde i to timer ved romtemperatur. Platene ble vasket fem ganger med PBS-Tween. Anti-M13 HRP konjugat ble benyttet for deteksjon av fagbinding til E. coli celler som uttrykte A3 domenet eller til et irrelevant antigen på deres overflate. Platene ble vasket fem ganger med PBSTween. Farging ble utført med ABTS/H₂O₂ og signaler ble målt etter 30 minutter ved 405 nm.
- 15 Resultater er oppsummert i Tabell 7.

Eksempel 12: Bivalent og bispesifik VHHs: ekspresjon og rensing

E. coli produksjonsvektoren pAX11 ble utformet (Figur 6), hvilken tillater to-trinnskloning av bivalent eller bispesifikt VHH.

- 20 Den karboksyterminale VHH ble klonet først med PstI and BstEII, mens i det andre trinnet ble den andre VHH satt inn med SfiI og NotI, som ikke kutter innen det første genfragmentet. Prosedyren unngår underbyggingen av nye seter ved amplifikasjon og således risikoen for introduksjon av PCR-feil. Sekvensen er vist i Tabell 30 (SEQ ID nummer 8, 9, 10, 11 og 12).

- Protein ble uttrykt og rensert som beskrevet i Eksempel 6. Et ekstra rensetrinn var nødvendig på Superdex 75 fjerning av noe monovalent degraderingsprodukt (5-10%). Utbyttet oppnådd for 1 liter ekspresjon og rensing av bivalent protein i E. coli er oppsummert i Tabell 8.

Eksempel 13: Binding i ELISA til vWF

- Binding til vWF ble testet i ELISA som beskrevet i Eksempel 7 og sammenlignet med binding av monovalent VHH. Resultatene er vist i Figur 7. Det er klart fra resultatene at bivalent og bispesifikt VHH viser sterkere binding til vWF sammenlignet med

monovalent VHH.

Eksempel 14: Inhiberings ELISA med rensset VHH

Inhibering for binding av vWF til collagen ble testet for monovalent sammenlignet med
 5 bivalent VHHs som beskrevet i Eksempel 5. I stedet for anvendelse av vWF, ble
 humant, bavian- og svineplasma benyttet parallelt ved en fortykning på. IC50 verdier er
 vist i Tabell 9.

Eksempel 15: Stabilitet av bivalente eller bi-spesifikke konstrukturer i humant 10 plasma

Stabilitet av bivalente konstrukturer ble testet ved inkubering ved 37 °C i humant plasma.
 AM-4-15- 3/AM2-75 ble inkubert i humant plasma ved en konsentrasjon på 38 µg/ml
 ved 37 °C. En prøve ble tatt ut etter 1,2, 3,6 og 24 timers inkubering. Prøver ble
 fortynnet 10-ganger og analysert ved Western blot. Resultater er oppsummert i Figur 8
 15 og viser at det bivalente konstruktet er stabilt i minst 24 timer ved 37 °C i humant
 plasma.

Eksempel 16: Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Dekkglass (18x18 mm, Menzel Gläser) ble rensset over natten i en
 20 kromossvovelsyreoppløsning (2% kromtrioksid) og rensset med destillert vann før
 spraying. Monomert collagen type III ble oppløst i 50 mmol/L iseddik og sprayet med en
 tetthet på 30 µg/cm² på dekkglassene med en retusjerings-airbrush (Badger model
 100, Badger Brush Co). Etter sprayingsprosedyren ble collagenoverflaten blokkert i 1
 time med 1% humant albumin i PBS (10mmol/L fosfatbuffer, pH 7.4, og 0.15 mol/L
 25 NaCl) for å forhindre ikke-spesifikk proteinbinding under den påfølgende perfusjonen.
 Perfusjonsstudier over collagen type III ble utført i et spesielt utstyrt lite parallell-plate
 perfusjonskammer med veldefinerte reologiske karakteristikker for husing av
 dekkglass.

30 Helblod ble fremskaffet ved venipunktering av frivillige. Blod ble trukket gjennom
 perfusjonskammeret med en Harvard infusjonspumpe (pumpe 22, modell 2400-004;
 Harvard, Natick, MA). Perfusjonstiden var 5 minutter. Triplikate dekkglass ble satt inn i
 kammeret.

35 Fem milliliter helblod ble forvarmet ved 37 °C i 5 minutter med eller uten tilsetning av

VHH, og så resirkulert gjennom kammeret i 5 minutter ved en vegg-skjærrate på $300s^{-1}$ eller $1600s^{-1}$. Dekkglassene ble fjernet, rensert, fiksert med 0.05% glutaraldehyd, dehydrert med metanol, og farget med May-Grünwald/Giemsa. Blodplateadhesjon ble kvantifisert med et lysmikroskop (1,000X forstørring) forbundet til en datamaskinbasert bildeanalysator (AMS 40-10, Saffron Walden, UK). Blodplateadhesjon ble uttrykt som prosent av overflaten dekket med blodplater. Resultater er oppsummert i Tabell 10 og 11.

Valg av bindere for vWF inhibering av samvirkning med blodplater (figur 9).

10 Eksempel 17: Seleksjon av bindere for vWF inhibering av samvirkningen med blodplater : panorering

Immunorør ble belagt med 2 $\mu\text{g/ml}$ vWF eller med PBS inneholdende 1% kasein. Etter over natten inkubering ved 4 °C, rørene ble blokkert med PBS inneholdende 1% kasein, i 3 timer ved RT. 200 μl fag ble tilsatt til immunorørene med et endelig volum på 2 ml i PBS. Etter 2 timer inkubering ved RT, ble immunorørene vasket 10x med PBS-Tween og 10x med PBS. Bundne fag ble eluert med 2 ml 0.2 M glycinbuffer pH= 2.4. Elusjoner ble utført i 20 minutter ved romtemperatur. Eluerte fag ble tillatt å infisere eksponentielt voksende TG1 celler, og ble så sådd på LB agar-plater inneholdende 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin og 2% glukose. Resultatene fra panoreringen er vist i Tabell 12.

20

Eksempel 18: Screening for binding til A1 domenet av vWF

pBAD-Oprl-strep-spec-vektoren ble benyttet for å fremvise VWF A1 domenet som en fusjon med Oprl på overflaten av UT5600 E. coli celler (F-ara-14 leuB6 azi-6 lacY1 proC14 tsx-67 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109xyl-5mtl-1thi1 DompT fepC266) (Cote-Sierra et al, 1998, Gene, 221: 25-34). Genet som koder for A1 domenet av vWF (219aa) ble amplifisert ved PCR ved bruk av A1for og A1back PCR-primere.

A1for : CCG GTG AGC CCC ACC ACT CTA AGC TTG GAG GAC ATC TCG GAA CCG (SEQ ID Nr. 70)

A1 back : CCC CAG GGT CGA AAC CCT CTA GAG CCC CGG GCC CAC AGT GAC (SEQ ID Nr. 71)

Fragment og vektor ble kuttet med HindIII og XbaI, ligert og transformert i UT5600 (=pBAD-vWFA1/pBAD-vWFA3). Transformerte celler ble utsådd på LB agarplater inneholdende 20 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 50 $\mu\text{g/ml}$ spectinomycin.

35 pBAD-vWFA1 plasmidet ble transformert i UT5600F-celler og sådd på LB agarplater

med 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin. En enkel koloni ble benyttet for å inokulere LB medium med 20 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml spectinomycin. Celler ble dyrket over natten ved 37 °C ved 200 RPM. Den neste dagen ble celler induisert med 0.2% arabinose og inkubert i ytterligere 1 time ved 37 °C ved 150 RPM. Totale
 5 cellelysater ble kokt i reduserende prøvebuffer, satt på en 12% SDS-PAGE og overført til nitrocellulose for Western blotting.

Overførte proteiner ble detektert ved bruk av et monoklonalt anti-Opri antistoff (SH2.2) (Cote- Sierra et al, 1998, Gene, 221: 25-34). Et anti-mus IgG konjugert med alkalisk
 10 fosfatase ble benyttet (Sigma), og blottene ble utviklet med BCIP/NBT som vist i Figur 10.

ELISA ble utført som beskrevet i Eksempel 11. Resultater er oppsummert i tabell 13. Resultatene indikerer at vWF-A1 domene-spesifikke VHH er fremskaffet.

15 **Eksempel 19: Seleksjon av binders for vWF inhibering av samvirkningen med blodplater : MATCHM**

E. coli celler som uttrykker A1 domenet av vWF (Eksempel 18) ble benyttet for et MATCHM eksperiment: UT5600 celler transformert med pBAD-Opri-A1 ble dyrket og induisert med 0.2% arabinose. Celler ble vasket og inkubert med fagene i 1 time ved
 20 RT. Blandingen ble vasket 7 ganger med PBS-Tween og fag ble eluert med eksponentielt voksende TG1 celler. Vi utførte en første og en andre runde seleksjon. Resultater er oppsummert i Tabell 14.

Eksempel 20: ELISA: binding til vWF av rensset VHH

25 VHH spesifikt for A1 domenet av vWF ble uttrykt og rensset som beskrevet i Eksempel 6. Binding i ELISA til vWF ble målt som beskrevet i Eksempel 7. Resultater er vist i Figur 11.

Eksempel 21: Inhiberings ELISA med rensset VHH

30 En mikrotiterplate ble belagt over natten ved 4 °C med et antistoff spesifikt for blodplatereseptor gplb ved 5 µg/ml i PBS. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween, og blokkert med 300 µl PBS-1 % kasein i 2 timer ved romtemperatur. Platen ble vasket 3 ganger med PBS-Tween. Blodplatereseptor gplb(gplb) ble tilført til brønner på mikrotiterplaten ved en konsentrasjon på 1 µg/ml og tillatt å binde i 2 timer ved
 35 romtemperatur. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween. VHH (A38 (negativ

kontroll) og A50 (vWF A1 binder)) ble tilsatt ved avtakende konsentrasjon. Plasma inneholdende vWF ble pre-inkubert ved en fortykning på 1/128 ved 37 °C i 5 minutter.

Risto ble tilsatt ved en final konsentrasjon på 760pg/ml og tilsatt til VHH. Denne blandingen ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. 100 µl av denne blandingen ble så hatt i en mikrotiterplatebrønn og inkubert i 90 minutter ved romtemperatur.

Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween. Et anti-vWF-HRP monoklonalt antistoff ble fortynnet 3.000 ganger i PBS og inkubert i 1 time. Platen ble vasket fem ganger med PBS-tween og vWF-binding ble detektert med ABTS/H₂O₂. Signaler ble målt etter 30 minutter ved 405 nm. Resultater er oppsummert i Figur 12.

10

Eksempel 22: Sekvensering av klonene

Kloner ble sekvensert med M13 universal revers primer. Aminosyresekvenser er vist i Tabell 30 (SEQ ID nummer 23,24, 25,26, 27,28, 29,30 og 31).

15 Eksempel 23: Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Skjærekspesimenter ble utført som beskrevet i Eksempel 16. Blodplateadhesjon ble uttrykt som prosentdelen av overflaten som var dekket med blodplater. Resultater er oppsummert i Tabell 15 og 16.

20 Eksempel 24: Bivalente VHHs: ekspresjon og rensing

Bivalente molekyler ble konstruert som beskrevet i Eksempel 12. Sekvensen er vist i Tabell 30 (SEQ ID nummer 32,33 og 34).

Protein ble uttrykt og rensert som beskrevet i Eksempel 6. Et ekstra rensetrinn på superdex 75 var nødvendig for fjerning av noe monovalent degraderingsprodukt (5-10%).

25

Eksempel 25: Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Skjærekspesimenter ble utført som beskrevet i Eksempel 16. Blodplateadhesjon ble uttrykt som prosenten av overflaten som var dekket med blodplater. Resultater er oppsummert i Tabell 17 og 18.

30

Fremstilling av bi-spesifikke konstrukter for vWF-spesifikk VHH (Figur 13)

Eksempel 26: Konstruksjon og sekvens av bi-spesifikke konstrukter

Konstrukter ble fremstilt som beskrevet i Eksempel 12, med et VHH spesifikt for vWF og inhibering av samvirkningen med collagen, og det andre VHH også spesifikt for

35

vWF, men inhiberer samvirkningen med blodplatereseptor gplb ; Sekvenser er vist i Tabell 30 (SEQ ID nr: 20,21 og 22)

Eksempel 27: Ekspresjon og rensing av bi-spesifikke konstrukter

5 Protein ble uttrykt og rensset som beskrevet i Eksempel 6. Et ekstra rensetrinn på superdex 75 var nødvendig for fjerning av noe monovalent degraderingsprodukt (5-10%). Utbyttet fremskaffet fra 1 liter ekspresjon og rensing av bispesifikt protein i *E. coli* er oppsummert i Tabell 19.

10 **Eksempel 28: Binding til vWF**

Binding til vWF ble testet i ELISA som beskrevet i eksempel 7. Resultater er vist i Figur 14.

15 **Eksempel 29: Inhibering av binding av vWF til collagen ved de bi-spesifikke konstruktene sammenlignet med de monovalente VHHs**

Inhibering for binding av vWF til collagen ble testet for monovalente sammenlignet med bi-spesifikke konstrukter som beskrevet i eksempel 5. IC50 verdier er oppsummert i Tabell 20.

20 **Eksempel 30: Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.**

Skjærekspesimenter ble utført som beskrevet i Eksempel 16. Blodplateadhesjon ble uttrykt som prosentdelen av overflaten som var dekket med blodplater. Resultater er oppsummert i Tabell 21 og 22.

25 **Screening for bindere for collagen type I og type III H (Figur 15)**

Eksempel 31: Seleksjon av bindere for collagen type I

En mikrotiterplate ble belagt med 25 µg/ml collagen type 1. Fag ble preparert som beskrevet i Eksempel 3 og tillatt å binde seg til veggen i en mikrotiterplate som ble blokkert i 2 timer. Etter vasking, ble fag eluert med 0.1 M glycinbuffer pH=4.5.

30 Resultater er oppsummert i Tabell 23.

Eksempel 32: Test av VHH i ELISA for binding til collagen type I og type III.

Kloner ble testet for binding i ELISA som beskrevet i eksempel 7, men nå på collagen type I eller type III belagte brønner ved 25 µg/ml i PBS. Resultatene er oppsummert i

35 Tabell 24.

Eksempel 33: Sekvensering av klonene

Kloner ble sekvensert med M13 universal revers primer. Aminosyresekvenser er vist i Tabell 30 (SEQ ID nummer 35, 36 og 37).

5

Eksempel 34: Binding av renset VHH til collagen type I og type III

VHH ble uttrykt og renset som beskrevet i Eksempel 6. En mikrotiterplate ble belagt med 25 µg/ml collagen type I eller type III og blokkert. Bindere ble satt på in duplo fortynninger og binding ble detektert som beskrevet i Eksempel 7. Resultater er oppsummert i Figur 16.

10

Eksempel 35: Seleksjon av bindere for collagen type I inhibering av samvirkningen med vWF

En mikrotiterplate ble belagt med 25 µg/ml collagen type 1. Fag ble preparert som beskrevet i Eksempel 3 og tillatt å binde til brønnen i en mikrotiterplate som ble blokkert i 2 timer. Etter vasking ble fag eluert med 300 µg/ml vWF. En andre og tredje seleksjonsrunde ble utført på den samme måten.

15

Eksempel 36: Test av VHH i ELISA for binding til collagen type I og type III.

Kloner ble testet for binding til collagen type I og type III i ELISA som beskrevet i Eksempel 34.

20

Eksempel 37: Sekvensering av klonene

Kloner ble sekvensert med M13 universal revers primer.

25

Eksempel 38: Binding av renset VHH til collagen type I og type III

VHH ble uttrykt og renset som beskrevet i eksempel 6. En mikrotiterplate ble belagt med 25 µg/ml collagen type I eller type III og blokkert. Bindere ble satt på in duplo fortynninger og binding ble detektert som beskrevet i Eksempel 34.

30

Eksempel 39: Test av inhibering av binding av vWF til collagen ved collagen-spesifikk VHH i ELISA

Inhibering ble testet som beskrevet i Eksempel 5.

35

Eksempel 40: Test av inhibering av blodplateaggregering ved collagen-spesifikk

VHH ved lav og ved høy skjær

Skjærekspesimenter ble utført som beskrevet i Eksempel 16. Blodplateadhesjon ble uttrykt som prosentdelen av overflaten som var dekket med blodplater.

5 Forbedret halveringstid for VHH**Eksempel 41: Immunisering av lama**

En lama ble immunisert med humant serum albumin (HSA). Immuniseringskjemaet er oppsummert i Tabell 25.

10 Eksempel 42: Repertoarkloning

Biblioteket ble preparert som beskrevet i Eksempel 2. Størrelsen av biblioteket var 2×10^7 cfu, og alle klonene inneholdt insert med den korrekte størrelsen.

Eksempel 43: Gjenvinning av biblioteket, fagfremstilling

15 Fag ble preparert som beskrevet i Eksempel 3.

Eksempel 44: Fag-ELISA

En mikrotiterplate (Maxisorp) ble belagt over natten ved 4 °C med PBS-1 % kasein eller med 5 my/ml HSA (human serum albumin). Platen ble vasket 3 ganger med PBS-
 20 Tween (0.05% Tween20) og blokkert i 2 timer ved romtemperatur med 200 µl PBS-1 % kasein. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween. Fag ble preparert som beskrevet ovenfor og satt i brønner etter hverandre følgende togangers fortyninger. Plater ble vasket fem ganger med PBS-Tween. Bundet fag ble detektert med et mus monoklonalt antistoff anti-M13 konjugert med pepperrotperoxidase (HRP) fortennet
 25 1/2000 i PBS. Platene ble vasket fem ganger med PBS-Tween. Farging ble utført med ABTS/H2O2 og signaler ble målt etter 30 minutter ved 405 nm. Resultater er vist in Figur17 og indikerer nærværet av HSA-spesifikke nanobodies i biblioteket.

Eksempel 45: Seleksjon: første og andre runde med biopanning

30 En brønn i en mikrotiterplate ble belagt med 10 µg/ml mus serum albumin (MSA), eller med PBS inneholdende 1% kasein. Etter over natten inkubering ved 4 °C, ble brønner blokkert med PBS inneholdende 1 % kasein, i 3 timer ved RT. 200 µl fag ble tilsatt til brønnene etter 2 timer inkubering ved RT, brønner ble vasket 10x med PBS-Tween og 10x med PBS.

Bundne fag ble eluert med 100 µl gel 0.2 M glycinbuffer pH= 2.4. Elueringer ble utført i 20 minutter ved romtemperatur. Eluerte fag ble tillatt å infisere eksponentielt voksende E.coli TG1 celler, og ble så sådd på LB agarplater inneholdende 100 µg/ml ampicillin og 2% glukose. En andre runde ble utført med de samme betingelser som beskrevet

5 ovenfor. Resultater er oppsummert i Tabell 26.

Eksempel 46: Screening av individuelle kloner etter biopanorering

ELISA: binding til human serum albumin (HSA) og mus serum albumin (MSA)

Periplasmisk ekstrakt ble preparert som beskrevet i Eksempel 6.

10 En mikrotiterplate ble belagt med 5 µg/ml HSA, med 5 µg/ml mus serum albumin (MSA) eller med PBS-1% kasein, over natten ved 4 °C. Plater ble blokkert i to timer ved romtemperatur med 300 µl 1% kasein i PBS. Platene ble vasket tre ganger med PBS- Tween. Periplasmisk fraksjon ble preparert for 23 individuelle kloner etter første

15 vasket seks ganger med PBS-Tween, etter hvilke binding av nanobody ble detektert ved inkubering med muse anti-Histidin monoklonalt antistoff Serotec MCA 1396 (1/1000 fortykning) i PBS i 1 time ved RT fulgt av anti-mus-alkalisk fosfatase konjugat 1/2000 i PBS, også i 1 time ved RT. Farging ble utført med substratet PNPP(p-nitrofenyl-fosfat, 2mg/ml i 1M dietanolamin, 1mM Mg₂SO₄, pH 9.8) og signalene ble

20 målt etter 30 minutter ved 405 nm. Resultater er oppsummert i Tabell 27.

Eksempel 47: Hinfl-mønster og sekvensering

En PCR ble utført på positive kloner etter den andre runden av panorering, med et sett av primere som binder til en sekvens i vektoren. PCR-produktet ble kuttet med

25 restiksjonsenzymet Hinfl og satt på en agarosegel. 4 kloner ble selektert med et forskjellig Hinfl-mønster for videre evaluering. De klonene ble sekvensert, og resultater er oppsummert i Tabell 30 (SEQID nummer 16,17, 18 og 19).

Eksempel 48: Test av kryss-reaktivitet med albumin fra forskjellige arter

30 SDS-PAGE ble kjørt for plasma (1/10 fortykning) fra forskjellige arter (bavian, svin, hamster, menneske, rotte, mus og kanin) og blottet på en nitrocellulosemembran. Fag ble preparert for kloner MSA 21, MSA 24, MSA 210, MSA212 og et irrelevant nanobody som beskrevet i Eksempel 3. Fag ble tillatt å binde til nitrocelluloseblottet serumalbuminer og ikke-bundet fag ble vasket bort. Binding ble detektert med et anti-

35 M13 polyklonalt antistoff koplet til HRP. DAP ble benyttet som et substrat for deteksjon.

Resultater er vist in Figur18.

5 Fra disse resultater kan vi konkludere at alle 4 bindere er kryss -reaktive mellom svin, menneske, mus (bortsett fra MSA212) og hamster serumalbumin. MSA 21 er også kryss cross-reaktivt med kanin serumalbumin. Med det irrelevant nanobody ble ingen binding observert (ikke vist).

10 Som et kontroll eksperiment, ble en SDS-PAGE kjørt med de forskjellige plasmaprøvene fortynnet 1/100 i PBS. Gelen ble farget med coomassie. Vi kan konkludere fra Figur 19 at albuminnivåer i alle plasmaprøvene er høye, bortsett fra for kaninplasma med lave nivåer av albumin.

Eksempel 49: Ekspresjon og rensing

15 Protein ble uttrykt og rensert som beskrevet i Eksempel 6.

Eksempel 50: ELISA på MSA av de rensede nanobodies

20 En mikrotiterplate ble belagt med 5 µg/ml MSA over natten ved 4 °C. Etter vasking ble platen blokkert i 2 timer ved RT med PBS-1 % kasein. Prøver ble satt på i duplikat, med start ved en konsentrasjon på 2500 nM med 1/3 fortynninger og tillatt å binde seg i 2 timer ved RT. Et polyklonalt kanin anti-nanobody-serum ble tilsatt ved 1/1000 (K208) i en time ved RT.

25 Deteksjon var med anti-kanin alkalisk fosfatase konjugat ved 1/1000 og farging med PNPP. Resultater er vist i Figur20.

Eksempel 51: Konstruksjon og sekvens av bi-spesifikke konstrukter

30 Bi-spesifikke konstrukter ble preparert med det første VHH spesifikt for albumin (MSA21) og det andre VHH spesifikt for vWF (Figur 21). Konstrukter ble fremstilt som beskrevet i Eksempel 12. Sekvenser er vist i Tabell 30 (SEQ ID nummer 13,14 og 15)

Eksempel 52: Ekspresjon og rensing av bi-spesifikke konstrukter

Protein ble uttrykt og rensert som beskrevet i Eksempel 6. Et ekstra rensetrinn på superdex 75 var nødvendig for fjerning av noe monovalent degraderingsprodukt (5-10%).

Eksempel 53: Funksjonalitet av begge VHHs i det bi-spesifikke konstruktet

En mikrotiterplate ble belagt med 5 g/ml mus serumalbumin over natten ved 4 °C. Etter vasking av platen, ble brønner blokkert i 2 timer med PBS-1% kasein. De bi-spesifikke proteinene ble tillatt å binde til brønner i 2 timer ved RT. Etter vasking ble humant, hunde- og svineplasma ble tilsatt ved forskjellige fortyninger og tillatt å binde i 2 timer ved RT. Binding av vWF ble detektert med anti-vWF-HRP fra DAKO ved 1/3000 fortyning. Farging ble utført med ABTS/H2O2. Resultater er vist i Figur 22 og indikerer at funksjonaliteten til begge VHHs blir opprettholdt i de bi-spesifikke konstruktene.

10

Eksempel 54: Inhibering av binding av vWF til collagen ved de bi-spesifikke konstruktene sammenlignet med de monovalent VHHs

Inhibering for binding av vWF til collagen ble testet for monovalente sammenlignet med bi-spesifikke konstrukt som beskrevet i Eksempel 5. IC50 verdier er oppsummert i Tabell 28. Resultater indikerer at de inhibitoriske egenskapene til VHH blir opprettholdt i de bi-spesifikke konstruktene.

15

Seleksjon av bindere for aplb som inhiberer samvirkningen med vWF (Figur 23)

Immunisering, repertoarkloning og fagfremstilling ble utført som beskrevet i Eksempel 1, 2, 3.

20

Eksempel 55: Seleksjon av bindere for rgplb

En mikrotiterplate ble belagt med et mus mAb mot rgplb. Platen ble blokkert og rgplb ble tillatt å binde i 2 timer ved RT ved 5 µg/ml. Platen ble vasket. Fag ble preparert som beskrevet ovenfor og tillatt å binde til brønner i mikrotiterplaten. Etter vasking ble fag eluert med 0.1 M glycinbuffer pH=4.5. En andre runde panorerer ble utført på samme måten.

25

Eksempel 56: Screening for bindere i ELISA.

Periplasmisk ekstrakt ble preparert som beskrevet i Eksempel 6.

30

The supernatant ble satt i to brønner belagt med mAb og deretter gplb, som beskrevet i Eksempel 55. Fortyningsserier av alle rensede prøvene ble inkubert i 2 timer ved RT. Plater ble vasket seks ganger med PBS-Tween, etter hvilket binding av VHH ble detektert ved inkubering med muse anti-His-HRP mAb 1/2000 i PBS i 1 time ved RT fulgt av farging med substratet ABTS/H2O2. Signalene ble målt etter 30 minutter ved

35

405 nm.

Eksempel 57: Binding av rensset VHH til rgplb

- 5 Periplasmisk fraksjon ble preparert som beskrevet i Eksempel 6. Supernatanten inneholdende VHH ble satt på Ni-NTA og rensset til homogenitet. Utbyttet av VHH ble beregnet ifølge ekstinksjonskoeffisienten. ELISA ble utført som beskrevet i Eksempel 55.

10 **Eksempel 58: Sekvensering av klonene**

Kloner ble sekvensert med M13 universal revers primer.

Eksempel 59: Test av inhibitoriske egenskaper til VHHs spesifikke for gplb

VHHs ble testet for inhibering i ELISA som beskrevet i Eksempel 21.

15

Eksempel 60: Evaluering av inhibering av VHH ved høy skjær.

Skjærekseksperimenter ble utført som beskrevet i Eksempel 16. Blodplateadhesjon ble uttrykt som prosentdel av overflaten dekket med blodplater.

20 **Belegging av stenter, slanger og rør, ballonger, katetere, transplantasjonsmateriale med VHH**

Eksempel 61: Stabilitet av VHH

- VHH C37 ble inkubert ved 37 °C og inhibering av binding av vWF til collagen ble målt ved forskjellige tidspunkt ved ELISA som beskrevet i Eksempel 7. Resultater ble sammenlignet med VHH lagret ved -20 °C og er vist i Figur 24. For sammenligning er aktivitetene til et scFv mot B3 antigen (Reiter et.al. Protein Engineering, 1994,7 : 697 - 704) vist, og nevnte scFv er modifisert ved introduksjon av en disulfidbinding mellomrammeverkrestene 44 og 105 for å øke dens stabilitet (dsFv). dsFv tapte 40% av sin aktivitet etter 60 timers inkubering ved 37 °C. Etter ett års inkubering ved 37 C, ble C37 ble analysert for sine inhibitoriske egenskaper sammenlignet med C37 lagret i fryseren. ELISA ble utført som beskrevet i Eksempel 5 med humant plasma ved en endelig fortykning på 1/200. Resultatene er vist i Figur 25 og indikerer at funksjonaliteten er fullstendig opprettholdt (IC50 verdi på 0.085 versus 0.1 µg/ml for C37 lagret ved 37 °C versus -20 °C). Derfor, er det forventet at VHH vil ha lang lagringstid.
- 25
- 30
- 35

Eksempel 62: VHH immobilisert i en polymer

En blanding av 0.5 ml 30% akrylamid; 1 ml 1M Tris pH= 7.5; 3.5 ml H₂O; 35 µl 10% APS; 3.5 µl TEMED ble fremstilt. I noen brønner ble VHH C37 tilsatt ved en endelig konsentrasjon på 10 µg/ml. Blandingen ble tillatt å polymerisere i brønner i 96-brønners plate i 3 timer ved RT. Humant plasma ble tilsatt ved forskjellige fortyninger med start med ufortynnet plasma. Etter 1 times inkubering ved RT, ble platen vasket og anti-vWF-HRP (DAKO) ble tilsatt ved 1/2000, i 1 time ved RT. Etter vasking av platen, ble substrat (ABTS/H₂O₂) tilsatt og OD_{405nm} ble målt. Resultatet er vist i Figur 26.

10 Resultatene indikerer at VHH forblir funksjonell etter immobilisering i en polymer.

Humanisering av C37**Eksempel 63: Innretting av C37 med DP-47**

Innretting av C37 nanobody (SEQ ID nummer 1) og en human VH3 kimlinje (DP-47) avslørte en høy grad av homologi:

- 4 AA endringer i FR1 i posisjoner 1, 5, 28 og 30
- 4 AA endringer i FR3 i posisjoner 74,75, 84 og 94
- 3 AA endringer i FR4 i posisjoner 104,108 og 111 som vist i Figur 27

20 Eksempel 64: Mutagenese av C37

C37 ble mutert ved bruk av en non-PCR basert sete-rettet mutagenesefremgangsmåte som beskrevet av Chen og Ruffner (Chen og Ruffner, Amplification of closed circular DNA in vitro, Nukleinsyres Research, 1998,1126-1127) og kommersialisert av Stratagene (Quickendring sitedirected mutagenesis).

25

Plasmid DNA ble benyttet som templat i kombinasjon med 2 mutagene primere (tabell 29) for å introdusere den ønskede mutasjon (er). De 2 primerne er hver komplementære til motsatte strenger av templatplasmid DNA. I en polymerasereaksjon ved bruk av Pfu DNA polymerasen ble hver av strengene forlenget fra primersekvensen under et syklisk program ved bruk av en begrenset mengde sykluser. Dette resulterte i en blanding av villtype og muterte strenger. Kutting med DpnI resulterte i en seleksjon av mutert in vitro syntetisert DNA. DNA ble felt og transformert til E. coli og analysert for den ønskede mutasjonen ved sekvensanalyse. Klonen med den korrekte sekvens ble betegnet C37-hum, aminosyresekvensen er i Tabell 30 SEQ ID nummerer 2.

30

35

Ekspresjon og rensing av C37-hum ble utført som beskrevet i Eksempel 6. Inhibering av binding v vWF til collagen for C37 ble sammenlignet med C37-hum som beskrevet i Eksempel 5. Resultater er vist i Figur 28. De viser klart at den humanisterte versjon av C37 forblir fullt funksjonell.

Posisjonene som fremdeles må bli humanister er: Q1, Q5, D104, Q108 og I111. Vi kan humanisere posisjon 1 og 5 uten tap inhibering siden disse aminosyrene ble introdusert ved FR1 primeren og forefinnes ikke naturlig i lamasekvensen. Vi kan også humanisere posisjon 111 siden vi isolerte en VHH som var identisk med C37 bortsett fra I111V (AM-2-75 SEQ ID nummer 3) med de samme funksjonelle karakteristikkene (Eksempel 9 og Tabell 6).

Posisjon 108 er løsemiddeleksponert i kamelid VHH, mens i humane antistoffer er denne posisjonen begravet ved VH-VL grenseflaten (Spinelli, 1996; Nieba, 1997). I isolerte VHs er posisjon 108 løsemiddeleksponert. Introduksjonen av en non-polar hydrofob Leu i stedet for polar uladd Gln kan ha en drastisk effekt på den intrinsiske foldbarhet/stabilitet til molekylet.

20 Fragmenter av anti-VWF VHHs

Eksempel 65: Ekspresjon av et VHH-CDR3 fragment av vWF-C37

CDR3 regionen av C37 ble amplifisert ved bruk av en sense primer lokalisert i rammeverk 4 regionen (Forward: CCCCTGGTCCCAGTTCCTC) (SEQ ID Nr. 72) og en anti-sense primer lokalisert i rammeverk 3 regionen (Revers: TGTGCTCGCGGGGCCGGTAC) (SEQ ID Nr. 73).

For å klonere CDR-3 fragmentet i pAX10, ble en andre runde PCR amplifikasjon utført med følgende primere som introduserer de nødvendige restriksjonssetene: Revers primer Sfi1:

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCTGTGCTCGCGGGGCCGGTAC (SEQ ID Nr. 74)

Forward primer Not1 :

GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCTGTGCTCGCGGGGCCGGTAC (SEQ ID Nr. 75)

PCR reaksjonene ble utført i 50 ml reaksjonsvolum ved bruk av 50pmol av hver primer. Reaksjonsbetingelsene for den primære PCR var 11 min ved 94 °C, fulgt av 30/60/120

sek ved 94/55/72 °C i 30 sykluser, og 5 min ved 72 °C. Alle reaksjonene ble utført med 2.5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP og 1.25U AmpliTaq God DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Brussels, Belgia).

- 5 Etter spalting med Sfi1 og Not1 ble PCR-produktet klonet i pAX10.

Isolering av konformasjon-spesifikke anti-vWF VHH's

Eksempel 66: Seleksjon via første og andre runde biopanning på rekombinant A1(rA1)

- 10 En brønn i en mikrotiterplate ble belagt med 5 µg/ml rekombinant A1 domene av vWF(rA1), eller med PBS inneholdende 1% kasein. Etter over natten inkubering ved 4 °C, ble brønner blokkert med PBS inneholdende 1% kasein, i 3 timer ved RT. 200 µl fag ble tilsatt til de to brønnene. Etter 2 timers inkubering ved RT, ble brønner vasket 10x med PBS-Tween og 10x med PBS. Bundne fag ble eluert med 100 µl 0.2 M
- 15 glycinbuffer, pH 2.4. Elueringer ble utført i 20 minutter ved romtemperatur. Eluerte fag ble tillatt for å infisere eksponentielt voksende E. coli TG1 celler og ble så utsådd på LB agarplater inneholdende 100 µg/ml ampicillin og 2% glukose. En andre runde ble utført under de samme betingelser som beskrevet ovenfor, men fagene ble re-suspendert i 10 µg/ml vWF. Brønner i mikrotiterplaten ble vasket 7 ganger i 30 minutter med 10
- 20 µg/ml vWF. Resultater er oppsummert i Tabell 31.

Eksempel 67: Screening av individuelle kloner etter biopanning

ELISA : binding til rA1 og vWF

- En enkel koloni ble benyttet for å starte en over natten kultur i LB inneholdende 2%
- 25 glukose og 100 µg/ml ampicillin. Denne over natten kulturen ble fortynnet 100 ganger i TB medium inneholdende 100 µg/ml ampicillin, og inkubert ved 37 °C inntil OD_{600nm}= 0.5. 1 mM IPTG ble tilsatt og kulturen ble inkubert i ytterligere 3 timer ved 37 °C eller over natten ved 28 °C. Kulturer ble sentrifugert i 20 minutter ved 10,000 RPM ved 4 °C. Pelleten ble frosset over natten eller i 1 time ved -20 °C. Deretter ble pelleten ble tint
- 30 ved romtemperatur i 40 minutter, re-suspendert i PBS og ristet på is i 1 time. Periplasmisk fraksjon ble isolert ved sentrifugering i 20 minutter ved 4 °C ved 20.000 RPM. Supernatanten inneholdende VHH ble benyttet for videre analyser.

En mikrotiterplate ble belagt med 2 µg/ml rA1 eller med 1µg/ml vWF, over natten ved

4 °C. Plater ble blokkert i to timer ved romtemperatur med 300 µl 1% kasein i PBS. Platene ble vasket tre ganger med PBS-Tween. Periplasmisk fraksjon ble preparert for 192 individuelle kloner etter den andre seleksjonsrunden, og tillatt å binde til brønner i mikrotiterplaten. Plater ble vasket seks ganger med PBS-Tween, etter hvilket binding av nanobody ble detektert ved inkubering med kanin polyklonalt anti-nanobody (1/2000 fortynning) i PBS i 1 time ved RT fulgt av et anti-kanin-HRP konjugat 1/2000 i PBS, også i en time ved RT. Farging ble utført med substratet ABTS/H₂O₂ og signalene ble målt etter 30 minutter ved 405 nm. Resultater er oppsummert i Tabell 32. Vi kan konkludere at 50 kloner bindet til rA1 og ikke til vWF.

10

Eksempel 68: Hinfl-mønster og sekvensering

En PCR ble utført på positive kloner for rA1 og negative for vWF, etter den andre runden panorering, med et sett av primere som binder til en sekvens i vektoren. PCR-produktet ble kuttet med restriksjonsenzymet Hinfl og satt på en agarosegel. 30 kloner med et forskjellig Hinfl-mønster ble selektert for videre evaluering. Disse klonene ble testet i mer detalj ved ELISA som beskrevet i eksempel 67. Blant de 30 klonene, ble 4 klart vist å ha møye høyere affinitet for rA1 enn for vWF. Dataene er vist i Figurene 29 (binding til rA1) og 30 (binding til vWF). Disse klonene ble sekvensert, og resultater er oppsummert i Tabell 30 (SEQ ID nummer 62 til 65).

20

Eksempel 69: Inhiberings ELISA

Inhibering av nanobodies for binding av vWF til gplb ble bestemt ved ELISA. En mikrotiterplate ble belagt over natten ved 4 °C med et antistoff spesifikt for blodplatereseptor gplb ved 5 µg/ml i PBS. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween, og blokkert med 300 µl PBS -1 % kasein i 2 timer ved romtemperatur. Platen ble vasket 3 ganger med PBS-Tween. Plasma ble satt i to brønner på mikrotiterplaten ved en 1/2 fortynning og tillatt å binde i 1.5 timer ved 37 °C. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween. VHH ble tilsatt ved synkende konsentrasjon. Plasma inneholdende vWF ble pre-inkubert ved en fortynning på 1/50 ved 37 °C i 5 minutter. Ristocetin ble tilsatt ved en endelig konsentrasjon på 1mg/ml og tilsatt til VHH. Denne blandingen ble så satt på i en mikrotiterplate-brønn og inkubert i 90 minutter ved 37 °C. Platen ble vasket fem ganger med PBS-Tween. Et anti-vWF-HRP monoklonalt antistoff ble fortynnet 3,000 ganger i PBS og inkubert i 1 time. Platen ble vasket fem ganger med PBS-tween og vWF-binding ble detektert med ABTS/H₂O₂. Signaler ble målt etter 30 minutter ved 405 nm.

35

FIGURER

- Figur 1.** Interaksjoner involvert i de første trinne av blodplateaggregering.
- 5 **Figur 2.** Interaksjoner involvert i de første trinnene av blodplateaggregering. Et VHH er indikert å inhibere samvirkningen mellom vWF og collagen.
- Figur 3.** Binding til vWF som bestemt ved ELISA, av rensset VHH som beskrevet i Eksempel 7.
- Figur 4.** ELISA for å teste inhibering ved VHH av binding v vWF til collagen som
10 beskrevet i Eksempel 9.
- Figur 5.** Western blot som viser ekspresjon av A3 domenet av vWF som en fusjon med Oprl på overflaten av E. coli som beskrevet i Eksempel 11.
- Figur 6.** Restriksjonskart av multiple kloning sete til PAX011 for konstruksjon av bivalente eller bi-spesifikke nanobodies.
15
- Figur 7.** Binding i ELISA til rensset vWF, for monovalent versus bivalent og bi-spesifikk VHH som beskrevet i Eksempel 13.
- Figur 8.** Stabilitet til bi-spesifikt VHH i humant plasma etter inkubering ved 37 °C i opptil 24 timer som beskrevet i Eksempel 15.
- 20 **Figur 9.** Samvirkninger involvert i de første trinnene i blodplateaggregering. Et VHH er indikert som inhiberende av samvirkningen mellom vWF og blodplater.
- Figur 10.** Western blot som viser ekspresjon av A1 domenet av vWF som en fusjon med Oprl på overflaten av E. coli som beskrevet i Eksempel 18.
- Figur 11.** Binding til vWF bestemt ved ELISA, av rensset VHH som beskrevet i
25 Eksempel 20.
- Figur 12.** Inhibering av binding av gplb til VWF av A50 og A38 (negativ kontroll) som beskrevet i Eksempel 21.
- Figur 13.** Samvirkninger involvert i de første trinnene av blodplateaggregering. Et bi-spesifikt konstrukt er indikert med en VHH spesifikk for vWF og inhibering av
30 samvirkningen mellom vWF og collagen- og den andre VHH spesifikk for vWF, men inhiberer samvirkningen mellom vWF og blodplater.
- Figur 14.** Binding i ELISA til vWF som beskrevet i Eksempel 28.
- Figur 15.** Samvirkninger involvert i de første trinn i blodplateaggregering. Et VHH er indikert spesifikt for collagen og inhiberer samvirkningen mellom vWF og collagen.
- 35 **Figur 16.** Binding av rensset VHH til collagen type I og type III i ELISA som

beskrevet i Eksempel 34.

Figur 17. Fag- ELISA for å vise at HSA-spesifikke nanobodies er til stede i biblioteket som beskrevet i Eksempel 44.

Figur 18. Binding av fag som uttrykker albuminbinderne, til plasma blottet på nitrocellulose som beskrevet i Eksempel 48.

Figur 19. Coomassie-farging av plasmaprøver på SDS-PAGE som beskrevet i Eksempel 48.

Figur 20. Binding av rensede nanobodies til musealbumin som bestemt ved ELISA som beskrevet i Eksempel 50.

Figur 21. Bi-spesifikke konstrukter med en VHH binding til albumin og en andre VHH binding til vWF for forbedring av halveringstiden som beskrevet i Eksempel 51.

Figur 22. Sandwich-ELISA som viser funksjonaliteten til begge VHHs i et bi-spesifikt konstrukt som beskrevet i Eksempel 53.

Figur 23. Samvirkninger involvert i de første trinn i blodplateaggregering. Et VHH indikert spesifikk for gplb og inhiberer samvirkningen mellom vWF og blodplater.

Figur 24. Restaktivitet for C37 lagret ved -20 °C sammenlignet med C37 inkubert ved 37 °C i opp til 94 timer. C37 stabilitet er sammenlignet med stabilitet til ascFv som er spesifikk for B3 antigen og en stabilisert form, dsFv (stabilisert med 2 disulfidbindinger) som beskrevet i Eksempel 61.

Figur 25. Inhibitorisk aktivitet for C37 lagret ved -20 °C sammenlignet med C37 inkubert ved 37 °C i 1 år som beskrevet i Eksempel 61.

Figur 26. Binding av vWF fra humant plasma til C37 immobilisert i arylamid som beskrevet i Eksempel 62.

Figur 27. Aminosyreinnretting av C37 med human kimlinjesekvens DP-47 som beskrevet i Eksempel 63.

Figur 28. Inhibering av binding av vWF til collagen som bestemt ved ELISA for C37 og C37 hum som beskrevet i Eksempel 64.

Figur 29. Binding av A11, A12, A13, A14, A15 og A16 kloner til rA1 som målt i ELISA

Figur 30. Binding av A11, A12, A13, A14, A15 og A16 kloner til vWF som målt i ELISA

TABELLER

Tabell 1. Immuniseringsplan benyttet for lama 002 ifølge Eksempel 1.

Tabell 2. Plakkdannende enheter (pfu) etter en eller to runde (r) av panorering på

vWF sammenlignet med PBS-kasein som beskrevet i Eksempel 4. Pfu vWF (antigen) delt med pfu kasein (aspesifikk binding) = anriking.

Tabell 3. Antall inhibitorer versus antallet kloner testet etter den første og den andre runden av panorering, som beskrevet i Eksempel 5.

5 **Tabell 4.** Utbytte (mg/liter kultur) etter ekspresjon og rensing av VHH dyrket i WK6E. coli celler som beskrevet i Eksempel 6.

Tabell 5. OD 405 nm for binding av VHH i ELISA til vWF og 3 antigener som også ble immunisert i lama002 ifølge Eksempel 8.

10 **Tabell 6.** Konsentrasjon av VHH (nM) som var nødvendig for å inhibere binding av vWF til collagen med 50% (IC50) som beskrevet i Eksempel 9.

Tabell 7. Epitopmapping av VHH binding til vWF og inhibering av samvirkningen med collagen som beskrevet i eksempel 11.

Tabell 8. Utbytter av rensed protein (mg) per liter kultur for bivalente og bi-spesifikke VHHs som beskrevet i Eksempel 12.

15 **Tabell 9.** IC50 verdier for monovalente sammenlignet med bivalente og bi-spesifikke VHHs. Inhibering ble testet med humant, svine- og bavianplasma som beskrevet i Eksempel 14.

Tabell 10. Inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær (1600s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 16.

20 **Tabell 11.** Inhibering av blodplateaggregering ved lav skjær (300s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 16.

Tabell 12. Plakkdannende enheter (pfu) etter en runde panorering på vWF som beskrevet i Eksempel 17. Pfu vWF (antigen) delt med pfu kasein (aspesifikk binding) = anrikning.

25 **Tabell 13.** Resultater av screening i ELISA av individuelle kolonier for binding til vWF og til A1 domenet av vWF som beskrevet i Eksempel 18.

Tabell 14. Resultater etter en runde av MATCHM på pBAD-OprI-A1 celler som beskrevet i Eksempel 19.

30 **Tabell 15.** Inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær (1600s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 23.

Tabell 16. Inhibering av blodplateaggregering ved lav skjær (300s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 23.

Tabell 17. Inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær (1600s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 25.

35 **Tabell 18.** Inhibering av blodplate aggregering ved lav skjær (300s⁻¹) som beskrevet

i Eksempel 25.

Tabell 19. Utbytter etter ekspresjon og rensing av bi-spesifikke konstrukter som beskrevet i Eksempel 27.

5 **Tabell 20.** IC50 verdier for bi-spesifikke nanobodies for A1 og A3 domenenene av vWF som beskrevet i Eksempel 29.

Tabell 21. Inhibering av blodplateaggregering at høy skjær (1600s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 30.

Tabell 22. Inhibering av blodplateaggregering ved lavskjær (300s⁻¹) som beskrevet i Eksempel 30.

10 **Tabell 23.** Plakkdannende enheter (pfu) etter en runde panorering på collagen type I som beskrevet i Eksempel 31. Pfu vWF (antigen) delt på pfu kasein (aspesifikk binding) = anrikning.

Tabell 24. Antall kloner som binder til collagen type I og type III etter en runde seleksjoner som beskrevet i Eksempel 32.

15 **Tabell 25.** Immuniseringsskjema for humant serum albumin ifølge eksempel 41.

Tabell 26. Resultater etter en og to runder panorering på mus serum albumin som beskrevet i Eksempel 45.

20 **Tabell 27.** Kloner ble selektert etter en og to runder seleksjon og periplasmiske ekstrakter ble preparert. Disse klonene analysert i ELISA for binding til humant og mus albumin som beskrevet i Eksempel 46.

Tabell 28. IC50 verdier for bi-spesifikke nanobodies mot albumin og mot vWF som beskrevet i Eksempel 54.

Tabell 29. Sekvenser av primerne benyttet for humanisering av C37 som beskrevet i Eksempel 64.

25 **Tabell 30.** Aminosyresekvenslisting av peptidene ifølge foreliggende oppfinnelse og av human von Willebrand faktor (vWF). Sekvensene av human vWF indikerer henholdsvis A1 og A3 domener med uthevede bokstaver.

Tabell 31. Resultater etter to panoreringsrunder på rA1 domenet av vWF som beskrevet i Eksempel 66.

30 **Tabell 32.** ELISA analyser v selekterte kloner for binding til rA1 og vWF som beskrevet i Eksempel 67.

Tabell 1: Immuniseringsskjema benyttet for lama002 ifølge eksempel 1.

Lama002 Dager av immunisering	vWF	Collagen Type I	Collagen Type III
0	100 µg	100 µg	100 µg
7	100 µg	100 µg	100 µg
14	50 µg	50 µg	50 µg
21	50 µg	50 µg	50 µg
28	50 µg	50 µg	50 µg
35	50 µg	50 µg	50 µg

- 15 Tabell 2: Plakkdannende enheter (PFU) etter en eller to runder panorering på vWF sammenlignet med PBS-kasein som beskrevet i eksempel 4. Pfu vWF (antigen) delt på pfu kasein (aspesifikk binding) = anrikning

Runde	Pfu vWf	Pfu kasein	Anrikning
Første	1×10^7	$2,5 \times 10^5$	40
Andre	5×10^8	$2,5 \times 10^6$	200

- 20 Tabell 3: Antall inhibitorer versus antallet kloner testet etter den første og andre runden panorering som beskrevet i eksempel 5.

Runde	Antallet inhibitorer versus antallet testede kloner
Første	4/800
Andre	4/96

Tabell 4: Utbytte (mg/liter kultur) etter ekspresjon og rensing av VHH dyrket i WK6 E. coli celler som beskrevet i eksempel 6.

Navn på VHH	Utbytte (mg/liter kultur)
22-2L-34	1,4
T76	2,9
AM-4-15-3	2,2
22-4L-16	2,8
C37	3,8
AM-2-75	3,6

5 Tabell 5: OD 405 nm for binding av VHH i ELISA til vWF og 3 antigener som også ble immunisert i lama002 ifølge eksempel 8.

OD405 nm	vWF			Antigen 1			Antigen 2			Antigen 3		
	670	67	6.7	670	67	6.7	670	67	6.7	670	67	6.7
T76	0.77	0.36	0.13	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.04	0.04	0.04	0.03
22-2L-34	1.30	0.63	0.20	0.06	0.0	0.10	0.10	0.07	0.05	0.06	0.05	0.03
22-4L-16	1.41	0.86	0.81	0.08	0.10	0.11	0.15	0.11	0.05	0.08	0.07	0.03
C37	1.51	1.09	1.06	0.10	0.10	0.12	0.12	0.11	0.08	0.10	0.08	0.06
AM-2-75	1.57	1.10	1.04	0.09	0.11	0.12	0.14	0.11	0.09	0.10	0.13	0.05
AM-4-15-3	1.32	1.08	0.56	0.09	0.12	0.12	0.12	0.11	0.10	0.10	0.10	0.08

Tabell 6: Konsentrasjon av VHH (nM) som var nødvendig for å inhibere binding av vWf til kollagen med 50% (IC50) som beskrevet i eksempel 9.

Navn på VHH	IC50 (nM) humant plasma 1/60	IC50(nM) ufortynnet humant plasma
22-2L-34	10	-
T76	30	-
AM-4-15-3	7	200
22-4L-16	4	1000
C37	3	-
AM-2-75	2	100

Tabell 7: Epitopmapping av VHH-binding til vWf og inhibering av interaksjonen med kollagen som beskrevet i eksempel 11.

Navn på VHH	Binding til A3-domenet av vWf
22-2L-34	Ja
T76	Nei
22-4L-16	Nei
C37	Ja
AM-2-75	Ja

5 Tabell 8: Utbytte av rensset protein (mg) per liter kultur for bivalente og bi-spesifikke VHHs som beskrevet i eksempel 12.

NH2-terminal VHH	COOH-terminal VHH	Utbytte mg/liter kultur
AM-2-75	AM-4-15-3	3.2
AM-4-15-3	AM-4-15-3	2.3
AM-4-15-3	AM-2-75	4.0
AM-2-75	AM-2-75	1.0
AM-2-75	22-4L-16	3.0

Tabell 9: IC50-verdier for monovalent sammenlignet med bivalente og bi-spesifikke VHHs. Inhibering ble testet med human, svine og bavian plasma som beskrevet i eksempel 14.

10

Første VHH	Andre VHH	IC50 (ng/ml) human plasma	IC50 (ng/ml) bavian plasma	IC50 (ng/ml) svine plasma
AM-2-75		150	400	50
AM-4-15-3		50	200	40
22-4L-16		15	70	7
AM-2-75	AM-4-15-3	3	5	6
AM-4-15-3	AM-2-75	2	8	3
AM-4-15-3	AM-4-15-3	5	10	7
AM-2-75	22-4L-16	8	20	10
AM-2-75	AM-2-75	5		

Tabell 10: inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær ($1600s^{-1}$) som beskrevet i eksempel 16.

	Konsentrasjon [$\mu g/ml$]	% inhibering
AM-2-75	0.2	0
AM-2-75	0.3	12
AM-2-75	0.4	56
AM-2-75	0.6	97
AM-2-75	0.8	96
AM-4-15-3	0.05	0
AM-4-15-3	0.1	75
AM-4-15-3	0.25	74
AM-4-15-3	0.5	86
AM-4-15-3	1	91
22-4L-16	0.1	32
22-4L-16	0.5	54
22-4L-16	0.75	86
22-4L-16	2	97
22-4L-16	10	99
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0.05	0
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0.075	23
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0.1	37
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0.15	56
AM-4-15-3/AM-4-15-3	0.2	98
AM-4-15-3/AM-4-15-3	1.9	100
AM-4-15-3/AM-2-75	1.9	100
AM-2-75/AM-4-15-3	0.05	2
AM-2-75/AM-4-15-3	0.1	36
AM-2-75/AM-4-15-3	0.2	96
AM-2-75/AM-4-15-3	0.35	91

AM-2-75/AM-4-15-3	0.4	98
AM-2-75/AM-2-75	0.04	5
AM-2-75/AM-2-75	0.1	26
AM-2-75/AM-2-75	0.2	52
AM-2-75/AM-2-75	0.3	80
AM-2-75/AM-2-75	0.4	99
AM-2-75/AM-2-75	0.83	100
AM-2-75/22-4L-16	1.17	99

Tabell 11: Inhibering av blodplateaggregering ved lav skjær (300 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 16.

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
AM-2-75	10	20
AM-4-15-3	10	17
22-4L-16	10	22
AM-4-15-3/AM-4-15-3	10	23
AM-4-15-3/AM-2-75	10	21
AM-2-75/AM-4-15-3	10	18
AM-2-75/AM-2-75	2	32
AM-2-75/22-4L-16	10	13

5

Tabell 12: Plakkdannende enheter (pfu) etter en runde panorering på vWf som beskrevet i eksempel 17. Pfu vWf (antigen) delt på pfu kasein (aspesifikk binding) =anrikning

Pfu vWf	Pfu kasein	Anrikning
$1,5 \times 10^7$	1×10^4	1500

Tabell 13: Resultater av screening i ELISA for individuelle kolonier for binding til vWF og A1-domenet av vWF som beskrevet i eksempel 18.

Antallet kloner +ve for vWF/antall testet	Antallet kloner +ve for A1/antall testet
344/380	5/570

5 Tabell 14: Resultater etter en runde MATCHM på pBAD-Opri-A1-celler som beskrevet i eksempel 19.

Runde	Antallet kloner +ve for vWF/antall testet	Antallet kloner +ve for A1/antall testet
Første		1/96
Andre	45/348	12/348

Tabell 15: Inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær (1600 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 23.

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
2A1-4L-129	13.5	26
2A1-4L-129	20	50
2L-A1-15	9.7	30
2L-A1-15	25	45
A50	10.2	20
2A1-4L-79	11.1	20
2A1-4L-34	11.1	3
Z29	10.6	0
I53	9.7	0
M53	10.6	0

Tabell 16: Inhibering av blodplateaggregering ved lav skjær (300 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 23.

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
2A1-4L-129	10	0
2L-A1-15	10	3
A50	25	0
2A1-4L-79	25	15

5 Tabell 17: Inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær (1600 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 25

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
2A1-4L-79/2A1-4L-79	25	54
2LA1-15/2LA1-15	25	45

Tabell 18: Inhibering av blodplateaggregering ved lav skjær (300 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 25

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
2A1-4L-79/2A1-4L-79	25	0
2LA1-15/2LA1-15	25	23

10

Tabell 19: Utbytte etter ekspresjon og rensing av bi-spesifikke konstrukter som beskrevet i eksempel 27.

NH2 terminal VHH	COOH-terminal VHH	Utbytte mg/liter kultur
2A1-4L-79	AM-4-15-3	7.5
2A1-4L-79	AM-2-75	2
2A1-4L-79	22-4L-16	2.5

15

Tabell 20: IC50-verdier for bi-spesifikke nanobodies for A1- og A3-domenet av vWF som beskrevet i eksempel 29.

NH2-terminal VHH	COOH-terminal VHH	IC50 (ng/ml)
2A1-4L-79	AM-4-15-3	10
AM-4-15-3	-	45
2A1-4L-79	AM-2-75	12
AM-2-75	-	40
2A1-4L-79	22-4L-16	10
22-4L-16	-	10
2A1-4L-79	-	>10000

- 5 Eksempel 21: Inhibering av blodplateaggregering ved høy skjær (1600 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 30.

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
2A1-4L-79/AM-4-15-3	12	100
2A1-4L-79/AM-2-75	0.02	0
2A1-4L-79/AM-2-75	0.1	28
2A1-4L-79/AM-2-75	0.5	79
2A1-4L-79/AM-2-75	1	95
2A1-4L-79/22-4L-16	12	96

Tabell 22: Inhibering av blodplateaggregering ved lav skjær (300 s^{-1}) som beskrevet i eksempel 30.

	Konsentrasjon [$\mu\text{g/ml}$]	% inhibering
2A1-4L-79/AM-4-15-3	10	15
2A1-4L-79/AM-2-75	10	25
2A1-4L-79/22-4L-16	10	27

Tabell 23: Plakkdannende enheter (pfu) etter en runde panorering på collagen type I som beskrevet i eksempel 31. Pfu vWF (antigen) delt på pfu kasein (aspesifikk binding) = anrikning

Fag eluert fra collagen type I	5×10^6
Fag eluert fra kasein	4×10^4
Anrikning	100

5 Tabell 24: Antall kloner som binder til collagen type I og type III etter en runde panorering som beskrevet i eksempel 32.

Collagen Type I	15/32
Collagen Type III	7/32
Casein	0/32

Tabell 25: Immuniseringskjema for humant serumalbumin ifølge eksempel 41.

Dag av immunisering	HSA Lama006
0	100 µg
7	100 µg
14	50 µg
21	50 µg
28	50 µg
35	50 µg

10

Tabell 26: Resultater etter en og to runder av panorering på mus serumalbumin som beskrevet i eksempel 45.

	Første runde	Andre runde
Pfu mus serumalbumin	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
Pfu kasein	5×10^3	$2,5 \times 10^3$
Anrikning	5000	10000

15

Tabell 27: Kloner ble valgt etter en og to runder seleksjon og periplasmiske ekstrakter ble preparert. Disse klonene ble analysert i ELISA for binding til humant og mus albumin som beskrevet i eksempel 46.

	Første runde	Andre runde
ELISA mus serumalbumin	1/16	15/16
ELISA humant serumalbumin	1/16	15/16
ELISA kasein	0/16	0/16

5 Tabell 28: IC50-verdier for bi-spesifikke nanobodies mot albumin og mot vWF som beskrevet i eksempel 54.

	IC50 (ng/ml)
AM-2-75	100
MSA21/AM-2-75	60
AM-4-15-3	155
MSA21/AM-4-15-3	245
22-4L-16	100
MSA21/22-4L-16	140

Tabell 29: Sekvenser av primere benyttet for humanisering av C37 som beskrevet i eksempel 64.

Mutasjon	Templat	Primersekvens
A74S+N75 K+P84A	Wild type	5'-AGA GAC AAC TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG-3' (SEQ ID N° 76) Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr (SEQ ID N° 77)
A74S+N75 K+P84A+R 94K	A74S+N75 K+P84A	5'-AT TAC TGT GCT AAA GGG GCC GGT ACT AGT T-3' (SEQ ID N° 78) Tyr Cys Ala Lys Gly Ala Gly Thr Ser (SEQ ID N° 79)
N28T+N30 S A74S+N75 K+P84A+R 94K	A74S+N75 K+P84A+R 94K	5'-TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACT TTC AGT TGG TA-3' (SEQ ID N° 80) Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp (SEQ ID N° 81)

Tabell 30: Aminosyresekvensliste til peptider ifølge foreliggende oppfinnelse og human von Hillebrand faktor (vWF). Sekvensen til human vWF indikerer henholdsvis A1 og A3 domeneene i fete typer.

Navn	Seq. ID Nr	Sekvens
		Anti-vWF A3 VHH
C37	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMWVRQAPGKLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTISS
C37- hum	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMWVRQAPGKLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCAKAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTISS
AM-2- 75	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMWVRQAPGKLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTVSS
22-2L- 34	4	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASVRIFTSYAMGWFRQAPGKEREVAAIN RSGKSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVSLQMDSLKLEDTAVYYCAADYSGSY TSLWSRPERLDWGQGTQVTVFS
22-4L- 16	5	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAIS WSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCVADTGGIS WIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
T76	6	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAASGSIIFSINTMGWYQAPGKQRELVAHIT FGGVTNYADSVKGRFTISRDNNTDVTYVYLQMNLSLRPEDTAVYICNAVWGGLT NYWGQGTQVTVSS
AM-4- 15-3	7	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIFSINSMGWYRQAPGKQRELVAHAL ADGSASYRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCNTVPSSVTK GYWGQGTQVTVSS
		Anti-vWF A3 domene VHH: bivalent eller bispesifikt
AM-4- 15- 3/ AM- 4-15-3	8	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIFSINSMGWYRQAPGKQRELVAHAL ADGSASYRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCNTVPSSVTK GYWGQGTQVTVSSSEPKTPKQPAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGS IFSINSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSASYRDSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNLSLRPEDTAVYYCNTVPSSVTKGYWGQGTQVTVSS
AM-4- 15- 3/ AM- 2-75	9	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIFSINSMGWYRQAPGKQRELVAHAL ADGSASYRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCNTVPSSVTK GYWGQGTQVTVSSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NFWYPMWVRQAPGKLEWVSTISTYGEPRYADSVKADSPSEPTPTTRCI CNEQPETEDTAVYYCARGAGTSSYLPQGRNWDQGTQVTVSS
AM-2- 75/ AM- 4-15-3	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMWVRQAPGKLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTVSSSEPKTPKQPAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCA ASGSIIFSINSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSASYRDSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCNTVPSSVTKGYWGQGTQVTVSS
AM-2- 75/ AM- 2-75	11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMWVRQAPGKLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTVSSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMW VRQAPGKLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRP EDTAVYYCARGAGTSSYLPQGRNWDQGTQVTVSS
AM-2- 75/ 22- 4L-16	12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMWVRQAPGKLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNANNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTVSSSEPKTPKQPAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCA ASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNLSLRPEDTAVYYCVADTGGISWIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
		Anti-vWF + anti-mus serumalbumin VHH

MSA21/ AM-2- 75	13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTRSDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS WYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKADSPSSETTPPTRICNE QPETEDTAVYYCARGAGTSSYLPQRGNWDQGTQVTVSS
MSA21/ AM-4- 15-3	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTRSDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS INSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSASYRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQ NSLKPEDTAVYYCNTVPSVTKGYWGQGTQVTVSS
MSA21/ 22-4L- 16	15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTRSDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS SYAMGWFRQAPGKEREVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCVADTGGISWIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
		Ant-mus serumalbumin VHH
MSA21	16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVFVWVSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPG GGQGTQVTVSS
MSA24	17	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCEASGFTFRNFGMSWVRQAPGKGVFVWVSSIS GGSNNTIYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSS
MSA210	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAIS SDSGTKNYADSVKGRFTISRDNKMLFLQMNLSLKPEDTAVYYCVIGRGS SQTQVTVSS
MSA212	19	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAIS ADGSDKRYADSVKGRFTISRDNKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGS SQTQVTVSS
MSAc16	49	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSGLTFSSAAMGWFRQAPGKEREVGAIK WSGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADRDRYR DRMGEMTTIDFRFWGQGTQVTVSS
MSAc11 2	50	QVKLEESGGGLVQVGGSLRLSCEASGFTFSSFAMGWFRQAPGREREFVASIG SSGITNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTGLCYCAVNRVYIP YRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
MSAc11 0	51	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCEASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMVATIS IGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVHRQTVVR GPYLLWGQGTQVTVSS
MSAc11 4	52	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREVAGSG RSNSYNYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASTNLWP RDRNLAYYWGQGTQVTVSS
MSAc11 6	53	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCEASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREVAAIS WSGGTTRYLDSVKGRFTISRSTKNAVYVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDSSGRL YWTLSYDYWGQGTQVTVSS

MSAc11 9	54	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLS CAASGRSLGIYKMAWFRQVP GKEREFFVAAIS WSGGTTRYIDSVKGRFTLSR DNTKNMVYLOMNSLKPDDTAV VYCAVDSSGRL YWTLSYDYWGQGTQVTVSS
MSAc15	55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFSPYTMGWFRQAP GKEREFLAGVT WSGSSTFYGDSVKGRFTASR DSAKNTVTLNEMNSLNPEDTAV VYCAAAYGGGL YRDRSYDYWGRGTQVTVSS
MScl11	56	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTLDANP IAWFRQAP GKEREVSCIR DGTYYADSVKGRFTISSD NANNTVYLOQNSLKPEDTAV VYCAAPSGPATGS SHTFGIYWNLRDDYDNWGQGT QVTVSS
MSAc11 5	57	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTFDHYTIGWFRQVP GKEREVSCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISS DNAKNTVYLOMNTLEPDDTAV VYCAAGLLLR VEEQASDYDYWGQGIQVTVSS
MSAc18	58	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CTASGFTLDYYAIGWFRQAP GKEREVACTS NSDGSTYYGDSVKGRFTISR DNAKNTVYLOMNSLKPEDTAV VYCATADRHS ASHHPFADFAPNSWGQGTQV TVSS
MSAc17	59	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAAYGLTFWRAAMAWFRAP GKERELVVARN WGDGSTRYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLOMNSLKPEDTAV VYCAAVRTYGS ATYDIWGQGTQVTVSS
MSAc12 0	60	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLS CIFSGRTFANYAMGWFRQAP GKEREFFVAAIN RNGGFTNYADALKGRFTISR DNTKNTAFLQMNLSLKPDDTAV VYCAAREWPF S TIPSGWRYWGQGTQVTVSS
MSAc14	61	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLS CAASGPTASSHAIGWFRQAP GKEREFFVGIN RGGVTRDYADSVKGRFAVSR DNVKNNTVYLOMNLKPEDSAI YICARPEYSF TAMSKGMDYWGKGLTVTVSS
		Anti vWF A1-domene VHH + anti vWG A3 domene VHH
2A1- 4L- 79/AM- 4-15-3	20	QVQLQDSGGRLVKAGASLRLS CAASGRTFSSLPMAWFRQAP GKEREFFVAFIG SDSSTLYTSSVRGRFTISR DNGKNTVYLOMNLKPEDTAV VYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTV SSEPKTPKPQAAAQVQLQDS GGGLVQPGGSL RLCAASGSIFSNMGWYRQAP GKQRELVAHALADGSASYR DSVKGRFTISR DNAKNTVYLOMNSLKPEDTAV VYCNTPSSVTKGYWGQGTQV TVSS
2A1- 4L- 79/AM- 2-75	21	QVQLQDSGGRLVKAGASLRLS CAASGRTFSSLPMAWFRQAP GKEREFFVAFIG SDSSTLYTSSVRGRFTISR DNGKNTVYLOMNLKPEDTAV VYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTV SSEPKTPKPQAAAQVQLQES GGGLVQPGGSL RLSCAASGFNFNWPMSWVRQ APGKLEWVSTISTYGEPRYAD SVKADSPSS ETTPTRCICNEQPETEDTAV VYICARGAGTSSYLPQRGNW DQGTQVTVSS
2A1- 4L- 79/22- 4 L-16	22	QVQLQDSGGRLVKAGASLRLS CAASGRTFSSLPMAWFRQAP GKEREFFVAFIG SDSSTLYTSSVRGRFTISR DNGKNTVYLOMNLKPEDTAV VYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTV SSEPKTPKPQAAAQVQLVES GGGLVQAGGSL RLSCAASGRTFSSYAMGWFRQ APGKEREFFVAAISWGGST YYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLOMNSLKPEDTAV VYCVADTGGISWIRTQGYN YWGQGTQVTV SS
		Anti vWF A1-domene VHH
A50	23	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFSSYRMGWFRQAP GKEREFFVAAIS RRGDNVYYADSVKGRFAISR DNAESTLYLOMNSLKPEDTAV VYCAAHVTVSA ITLSTSTYDYWGQGTQVTVSS
I53	24	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTKDMAWFRQPPGK EREFFVAIVYSSD GSTLVAASVKGRFTISR DNAKNTVYLOMTSLKPADTAV VYCATSRGYS GTY STSRDYWTGGTQVTVSS
Z29	25	QVQLQESGGGSVQAGDSLTL SCAASGRTFSMHAMGWFRQAP GKEREFFVAAIS

		PSAFTEYADSLKGRFTVSRDNAKLVWLQMNGLKPEDTAAYYCAARRGAFTA TTAPLYDYWGQGTQVTVSS
M53	26	QVQLQDSGGGLVQAGESLRLSCGTSGRTFGRRAMAWFRQAPGKERQFVAWIA RYDGSTLYADSVKGRFTISRDDNKNTMYLHMNLTPEdTAVYYCAAGPRGLY YESRYEYWGQGTQVTVSS
2A1- 4L-79	27	QVQLQDSGGRLVKAGASLRLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVRGRFTISRDNKNTVYLQMMNLKPEDTAVYYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSS
2A1- 4L-129	28	QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCAASGRSFSYPMWFRQAPGKEREFVVFVIG SDHSTLYSTSVRGRFTISRDNKNTVYLQMMNLKPEDTAVYYCAARNSAWSS GIYYRETSYDYWGQGTQVTVSS
2A1- 4L-34	29	QVQLQDSGGGSVQAGASLRLSCAASGGTFSSYAMWFRQAPGKEREFVGFVIG SDGSTLYSSSVRGRFTISRDNKNTVALQMMNLKPEDTAVYYCAARARYSGI YYRETDYPYWGQGTQVTVSS
2A1- 4L-78	30	QVQLQESGGGLVQAGASLRLSCTASGRSFGGFPMGWFRQAPGKEREFVSGLT RSLFTVYADSVKGRFTVSTDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAARPDLYAY SRDPNEYDYWGQGTQVTVSS
2LA1- 15	31	QVQLQDSGGGLVQSGGSLRLACAASGRIVSTYAMGWFRQSPGKEREFVATVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAKTKRTGIFTTARMVDYWGQ TQVTVSS
		Anti vWF A1-domene VHH : bispesifikk og bivalent VHH
2A1- 4L- 79/2A1 -4L-79	32	QVQLQDSGGRLVKAGASLRLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVRGRFTISRDNKNTVYLQMMNLKPEDTAVYYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGRLVKAGASL RLSCAASGRTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIGSDSSTLYTSSVRGRFTISR DNKNTVYLQMMNLKPEDTAVYYCAARSSAFSSGIYYREGSYAYWGQGTQV TVSS
2LA1- 15/2LA 1-15	33	QVQLQDSGGGLVQSGGSLRLACAASGRIVSTYAMGWFRQSPGKEREFVATVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAKTKRTGIFTTARMVDYWGQ TQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQDSGGGLVQSGGSLRLACAASGRIVSTYA MGWFRQSPGKEREFVATVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAK TKRTGIFTTARMVDYWGQGTQVTVSS
A50/A5 0	34	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAAIS RRGDNVYADSVKGRFAISRDNASTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAAHVTVSA ITLSTSTYDYWGQGTQVTVSSSEPKTPKPQAAAQVQLQESGGGLVQAGGSLR LSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAAISRRGDNVYADSVKGRFAISR DNASTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAAHVTVSAITLSTSTYDYWGQGTQVTV SS
		Anti collagen VHH
3P1-31	35	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRRYAMGWYRQAPGKQRELVAAIT SGGRTSVADTVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSKPEDAAVYYCTLYNSTTNY YNQSPSSWGQGTQVTVSS
3L-41	36	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRRYAMGWYRQAPGKQRLVAAIT SNGRPSVADSVKGRFTISSDTAKNTVYLQMNLSKPEDTALYYCTLYNTSADY YNQSPSSWGQGTQVTVLS
3P2-31	37	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTMGWFRQAPGKERQFVAALTWIG GSPVYADSVKGRFTTWRVLDNNTVYLHMNLSKPEDTAVYHCAAARTYYGNIS EYDYWGQGTQVTVSS
		Anti vWF VHH : humanisert

C37-3	38	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMSWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTISS
C37-4	39	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFWYPMSWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTISS
C37-8	40	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMSWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTISS
C37-10	41	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYPMSWVRQAPGKGLEWVSTIS TYGEPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSY LPQGRNWDQGTQVTISS
		Humanisert anti-vWF VHH + anti-mus serumalbumin VHH
MSA21/ C37- hum	42	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVVWVSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNP GGQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SWYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQGRNWDQGTQVTISS
MSA24/ C37- hum	43	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCEASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSIS GSGSNTIYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SWYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQGRNWDQGTQVTISS
MSA210 / C37- hum	44	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSFSGMSWVRQAPGKGLEWVSAIS SDSGTKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGS SQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS WYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQGRNWDQGTQVTISS
MSA212 / C37- hum	45	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAIS ADGSDKRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVIGRGS SQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS WYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKAGAGTSSYLPQGRNWDQGTQVTISS
		Antikollagen VHH : bispesifikt
3P1- 31/3P2 -31	46	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRRYAMGWYRQAPGKQRELVAAIT SGGRTSVADTVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTLYNSTTNY YNQSPSSWGQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSC AASGRTFTMGWFRQAPGKERQFVAALTWGGSPVYADSVKGRFTTWRVLDNN TVYLHMNSLKPEDTAVYHCAAARTYIGNISEYDYWGQGTQVTVSS
3L- 41/3P2 -31	47	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRRYAMGWYRQAPGKQRLVAAIT SNGRPSVADSVKGRFTISSDTAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTLYNSTADY YNQSPSSWGQGTQVTVLSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSC AASGRTFTMGWFRQAPGKERQFVAALTWGGSPVYADSVKGRFTTWRVLDNN

		TVYLLHMNSLKPEDTAVYHCAAARTYYGNISEYYDYWGQGTQVTVSS
		Conformation-specific Anti-vWF VHH
A11	62	EVQLVESGGRLVKAGASLRLSAASGRFTFSSLPMAWFRQAPGKEREFVAFIG SDSSTLYTSSVRGRFTISRDNKNTVYLQMMNLKPEDTAVYYCAARSSAFSS GIYYREGSYAYWGQGTQVTVSS
A12	63	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRFTFSTYALGWFRQVPGKGREFIAVIY WRDGSLSYSDSVKGRFTISKDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCANRHDSRG TYYSRSGYDYWGQGTQVTVSS
A13	64	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRFTKDMAWFRQPPGKEREFVAVIYSSD GSTLVAASVKGRFTISRDNKNTVYLQMTSLKPADTAVYYCATSRGYSGTYY STSRDYDYWGQGTQVTVSS
A15	65	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRFTKDMAWFRQPPGKEREFVAVIYSSD GSTLVAASVTGRFTISRDNKNTVYLQMTSLKPADTAVYYCASSRSGYSGTYY STSRDYDYWGQGTQVTVSS
		Konformasjonsspesifikk anti - vWF VHH
Human vWF	48	MIPARFAGVLLALALILPGTLC AEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYS FAGYCSYLLAGGCQKRFSFIIGDFQNGKRVLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQ GDQRVSMFYASKGLYLETEAGYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFN KTCGLCGNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSS SCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGG LECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSA CSPVCPAGMEYRQCVSPCARTC QSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLS RDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLAR DCQDHSFSIVLETVQCADDRDAVCTRSVTVRLPGLHNSLVKLVKHGAGVAMDG QDIQLPLLKGLDLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRLLVVKLSPVYAGKT CGLCGNYNGNQDDFLTPSGLAEPVDFGNWKLHGDCQDLQKHSDPCAL NPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECLCG ALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCCLNCPKGQVYLQCGTFCNLTCRSLSYPD EECNEACLEGCFPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYDGEIFQPEDIFSDHHTM CYCEDGMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADN LRAEGLECTKTCQNYDLECMMSGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQ GKEYAPGETVKIGCNTCVCRRDKWNC TDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYL FPGECQYVVLVDYCGSNPGTFRILVGNKGC SHPSVKCKKRVITLVEGGEIEL FDGEVNVKRP MKDETHFEVVEGGRYI ILLLGKALSVVWDRHLSLSVVLKQTY QEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVD FGNVSWKVSQCADTRKVP LD SSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSE SIGDCACFCDTIAAYAHVCAQH GKVVWRTATLCPQSC EERNLRENGYBCEW RYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPFGKILDELQTCVDPEDC PVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVNLTC EACQEPGGLVVPPT DAPVSPPTLYVEDISEPFLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFV VDMMERLRISQKWRVAVVEYHDGSHAYIGLKD RKRPS ELRRIASQVKYAGS QVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRIALLMASQEPQMSRNFVRYVQGL KKKVVIVIPVGIGPHANLQILRIEKQAPENKAFVLSVDELEQQRDEIVSY LCDLAP EAPPPTLPPHMAQVTGPGGLRNSMVL DVAFVLEGS DKIG EADFNRS KEFMEEVIQRMDVGD SIHVTVLQYSYMTVEYPFSEASKGD ILQRVREIR YQGNRNTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNLVYMTGNPASDEIKRLEP DIQVVP IGVGNANVQELERIGWPNAP ILIQDFETLPREAPDLVLRCCSGE GLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLD GSSSFPASTYFDEMKSFAKAFISKANIGP RLTQVSVLQYGSITITIDVPWVPEKAHLLSLVDVMQREGGFSQIGDALGFA VRYLTSEMHGARP GASKAVILVTDVSVDSVDAADAARSNRVTVPPIGIGD

		RYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRTIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRI CMD EDGNEKRPGDVWTLFPDQCHTVTCQPDGQTLKSHRVNCDRGLRPSCPNSQSP VKVEETCGCRWTCPCVCTGSSSTRHIVTFDQGNFKLTGSCSYVLFQNKQDLE VILHNGACSPGARQCGMKSLIEVKHSALSVLHSDMEVTVNGRLVSVPYVGGN MEVNVYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNNFQLQLSPKTFASKTYGLCGICD ENGANDFMLRDGTVTTDWKTIVQEWTVQRPGQTCQPILEEQLVPDSSHCOV LLLPLFAECHKVLAPATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASYAHLCRTNGVCVDW RTPDFCAMS CPPSLVYNHCEHGCPRHCDENVSSCGDHPSEGCFPPDKVMLE GSCVPEEACTQCI GEDGVQHQFLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCTTQPCP TAKAPTCGLCEVARLRQADQCCPEYECVCDPVS CDLPPVPHCERGLQPTLT NPGECRPNFTCACRKEECKRVSPPSCPPHRLPTLRKTQCCDEYECACNCVNS TVSCPLGYLASTATNDGCTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGGQFWEEGCDVCTC TDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRS GFYVLEHEGECGRCLPSACEVVTGS PRGDSQSSWKS VGSQWAS PENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSCPQLEVPVC PSGFQLSCKTSACCPSRCRMEACMLNGTVIGPGKTVMIDVCTTCRCMVQV GVLISGFKLECRKTTNCPPLGYKEENNTGECGRCLPTACTIQLRGGQIMTL KRDETLQDGDTHFKVNERGEYFWEKRVTCPPFDEHKCLABGGKIMKIPG TCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEVDIHYCQGKCASKAMYSIDIN DVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK
--	--	---

Tabell 31: resultater etter to runder panorering på rA1 domenet av vWF som beskrevet i eksempel 66

	Første bibliotek	Andre bibliotek	Tredje bibliotek
Pfu rA1	1×10^8	2×10^7	4×10^9
Pfu kasein	2×10^4	2×10^4	2×10^4
Anrikning	5000	1000	200000

5

Tabell 32: ELLISA-analyser av selekterte kloner for binding til rA1 og vWF som beskrevet i eksempel 67

	Første bibliotek	Andre bibliotek	Tredje bibliotek
ELISA rA1	54/64	51/64	49/64
ELISA vWF	36/64	35/64	33/64

P a t e n t k r a v

1.

5 Et polypeptidkonstrukt bestående av ett eller flere enkeltdomene antistoffer rettet mot von Willebrand Faktor (vWF) og eventuelt en peptidlinker, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at enkeltdomene antistoffet eller
antistoffene er valgt blant gruppen enkeltdomene antistoffer bestående av
sekvensen representert ved en hvilken som helst av SEQ ID nr: 1 til 3, 5 eller 7,
10 eller en homolog sekvens av en hvilken som helst av SEQ ID nr. 3, 5 eller 7
med en sekvensidentitet på mer enn 70% med den opphavelige sekvensen; og
hvor nevnte homologe sekvens er i stand til å hemme minst 50% blodplate-
aggregering ved en skjærrate på 1600 s^{-1} ved en konsentrasjon mellom 0,08 og
0,3 $\mu\text{g/ml}$.

15

2.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 1, hvor minst ett enkeltdomene antistoff
tilsvarer til en sekvens representert ved SEQ.ID nr. 3, eller en homolog sekvens
av SEQ ID nr. 3 med en sekvensidentitet på mer enn 70% med den
20 opphavelige sekvensen.

3.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 1, hvor minst ett enkeltdomene antistoff
tilsvarer til en sekvens representert ved SEQ.ID nr. 5, eller en homolog sekvens
25 av SEQ ID nr. 5 med en sekvensidentitet på mer enn 70% med den
opphavelige sekvensen.

4.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 1, hvor minst ett enkeltdomene antistoff
30 tilsvarer til en sekvens representert ved SEQ.ID nr. 7, eller en homolog sekvens
av SEQ ID nr. 7 med en sekvensidentitet på mer enn 70% med den
opphavelige sekvensen.

5.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 1, hvor polypeptidkonstruktet består av to enkeltdomene antistoffer rettet mot von Willebrand Faktor; og

- 5 i. Hvor minst et enkeltdomene antistoff tilsvarer til en sekvens representert ved SEQ ID nr. 3, eller en homolog sekvens av SEQ ID nr. 3 med en sekvensidentitet på mer enn 70%, eller
- ii. Hvor minst et enkeltdomene antistoff tilsvarer til en sekvens representert ved SEQ ID nr. 5, eller en homolog sekvens av SEQ ID nr. 5 med en sekvensidentitet på mer enn 70%, eller
- 10 iii. Hvor minst et enkeltdomene antistoff tilsvarer til en sekvens representert ved SEQ ID nr. 7, eller en homolog sekvens av SEQ ID nr. 7 med en sekvensidentitet på mer enn 70%.

6.

- 15 Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 5, ytterligere omfattende minst et enkeltdomene antistoff rettet mot serumalbumin, hvori minst ett enkeltdomene antistoff rettet mot serumalbumin tilsvarer til en sekvens representert ved en hvilken som helst av SEQ ID nr. 16 til 19, eller en homolog sekvens av en hvilken som helst av SEQ ID nr. 16 til 19 med en sekvensidentitet på mer enn
- 20 70% med den opphavelige sekvensen.

7.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 6 tilsvarende til en sekvens representert ved en hvilken som helst av SEQ ID nr. 13 til 15.

25

8.

Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 7, i hvilket minst et enkeltdomene antistoff er et VHH domene.

30 9.

Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 8, i hvilket minst et enkeltdomene antistoff er et VHH domene som blir oppnådd ved immunisering av en kamel og

fremskaffelse av hybridoma's derifra, eller ved kloning av et bibliotek av enkeltdomene antistoffer og deretter velge VHH ved bruk av fag-display.

10.

- 5 Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 9, i hvilket et enkeltdomene antistoff er humanisert.

11.

- 10 Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 10, i hvilket minst ett enkeltdomene antistoff er et humanisert VHH domene.

12.

- 15 Polypeptidkonstruktet ifølge krav 11, i hvilket minst ett enkeltdomene antistoff er humanisert ved erstatning av en eller flere av *Camelidae* aminosyrene med deres humane motsvarigheter som funnet i en human konsensussekvens.

13.

- 20 Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 12, i hvilke minst ett enkeltdomene antistoff er humanisert ved å erstatte en hvilken som helst av de følgende restene enten alene eller i kombinasjon: FR1 posisjoner 1, 5, 28 og 30, hallmark aminosyrene ved FR2 posisjonene 37, 44, 45 og 47, FR3 posisjonene 74, 75, 76, 83, 84, 93 og 94, og FR4 posisjonene 103, 104, 108 og 111, hvori nummereringen av posisjonene er ifølge Kabat-nummereringen.

25 14.

Polypeptidkonstruktet ifølge kravene 1 til 13, i hvilket den eventuelle peptidlinkeren består av tre alaninrester.

15.

- 30 Polypeptidkonstruktet ifølge krav 1-13, i hvilket den C-terminale enden av det første enkeltdomene antistoffet er forbundet til den N-terminale enden av det neste enkeltdomene antistoffet.

16.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 1 til 15, hvori nevnte homologe sekvens ikke er i stand til å hemme 50% av blodplateaggregeringen ved en skjærrate på 30
5 s⁻¹ ved 10 µg/ml eller ved lavere konsentrasjoner.

17.

En sammensetning omfattende et polypeptidkonstrukt ifølge kravene 1 til 16 og en farmasøytisk akseptabel bærer.
10

18.

Sammensetningen omfattende et polypeptidkonstrukt ifølge kravene 1 til 16, tilpasset til en valgt administrasjonsvei, hvor administrasjonsveien er oral eller parenteral, intra-nasal ved inhalering, intravenøs, intramuskulær, topikal eller
15 subkutan; og en farmasøytisk akseptabel bærer.

19.

En sammensetning omfattende et polypeptidkonstrukt ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16 og minst et trombolytisk middel, for samtidig, separat eller
20 sekvensiell administrasjon til et individ.

20.

Sammensetningen ifølge krav 19, hvor nevnte trombolytiske middel er en hvilken som helst av stafylokinase, vevs-plasminogen-aktivator, streptokinase, enkeltkjede streptokinase, urokinase og acyl-plasminogen streptokinase-kompleks.
25

21.

En nukleinsyre som koder for et polypeptidkonstrukt ifølge et hvilket som helst
30 kravene 1 til 16.

22.

Et polypeptidkonstrukt ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16 for anvendelse i behandlingen, forhindring og/eller lettelse av forstyrrelser relatert til blodplate-medierer aggregering eller dysfunksjon derav.

5

23.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 22, hvor nevnte forstyrrelser er hvilke som helst om oppstår ved ustabil angina, stabil angina, angina pectoris, embolusdannelse, dyp venetrombose, hemolytisk uremisk syndrom, hemolytisk anemi, akutt nyresvikt, trombolytiske komplikasjoner, trombotisk trombocytopenisk purpura, dissiminert intravaskulær koagelopati, trombose, koronar hjertesykdom, tromboemboliske komplikasjoner, myocardialt infarkt, restenose, og atriell trombosdannelse i atriell fibrillasjon, pre-eclampsia embolisme, restenosis og / eller trombose etter angioplasti, carotid endarterectomi, anastomose av vaskulære implantater, og kronisk eksponering for kardiovaskulære anordninger.

10

15

24.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 22 hvor nevnte forstyrrelser er en hvilken som helst som kommer av transient cerebralt ischemisk anfall, ustabil eller stabil angina, angina pectoris, cerebralt infarkt, myocardialt infarkt, perifer arteriell okklusiv sykdom, restenose, koronar by-passoperasjon, eller koronar arterieventilerstatning og koronare intervensjoner slik som angioplasti, stenting, karotid endarterektomi eller aterectomi.

20

25

25.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 22 hvor nevnte forstyrrelser er en hvilken som helst dannelsen av en non-okklusiv trombus, dannelsen av en okklusiv trombus, arteriell trombusdannelse, akutt koronar okklusjon, restenose, restenose etter PCTA eller stenting, trombusdannelse i stenoserter arterier, hyperplasi etter angioplasti, aterectomi eller arteriell stenting, okklusivt syndrom det vaskulære systemet eller mangel på åpenhet i syke arterier.

30

26.

Polypeptidkonstruktet ifølge krav 22 hvor nevnte forstyrrelse er plakk- eller trombusdannelse i høy-skjær-miljøer.

5

27.

En fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptidkonstrukt ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16, omfattende

- 10 (a) dyrking av vertsceller omfattende nukleinsyrer som koder for et polypeptid ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 16, under betingelser som tillater ekspresjonen av polypeptidet, og,
- (b) gjenvinning av det produserte polypeptidet fra kulturen.

28.

- 15 En fremgangsmåte ifølge krav 27, hvor nevnte vertsceller er bakterier eller gjær.

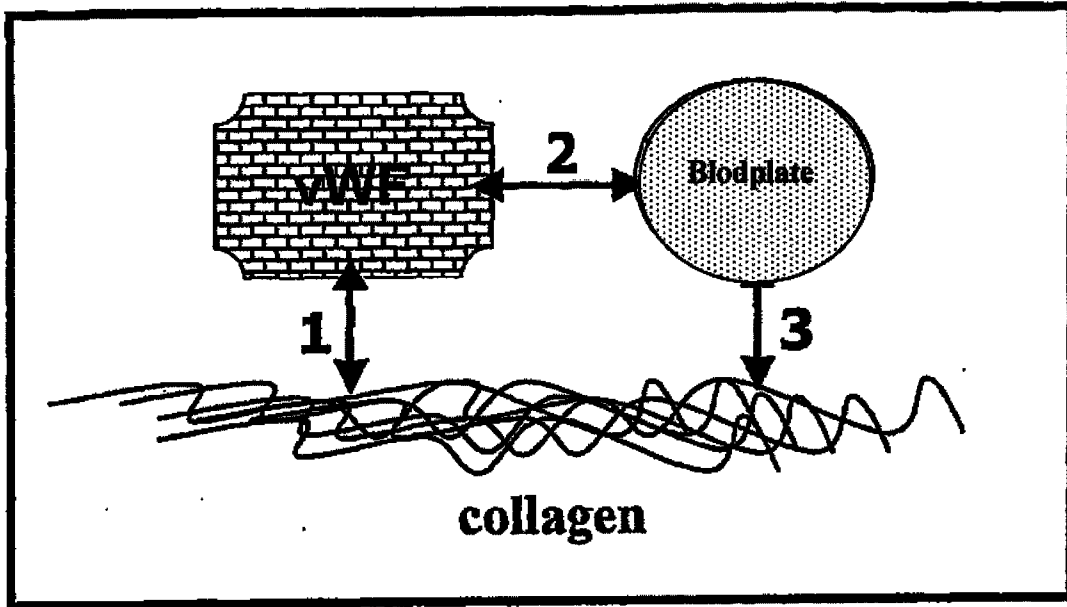
29.

En fremgangsmåte for diagnostisering av en sykdom eller forstyrrelser karakterisert ved dysfunksjon av blodplatedmediert aggregering omfattende

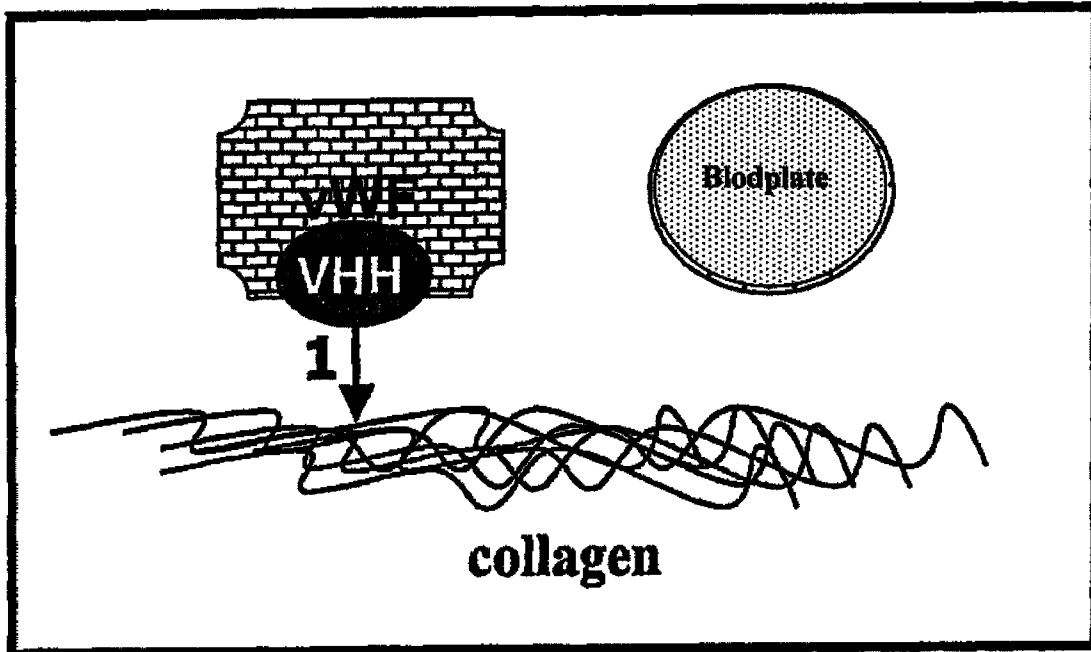
20 trinnene:

- (a) bringe i kontakt en prøve med et polypeptidkonstrukt ifølge kravene 1 til 16, og
- (b) detektering av binding av nevnte polypeptidkonstrukt til nevnte prøve, og
- (c) sammenligning av bindingen detektert i trinn (b) med en standard, hvor en forskjell i
- 25 binding relativt til nevnte prøve er diagnostisk for en sykdom eller forstyrrelser karakterisert ved dysfunksjon av blodplate-mediert aggregering.

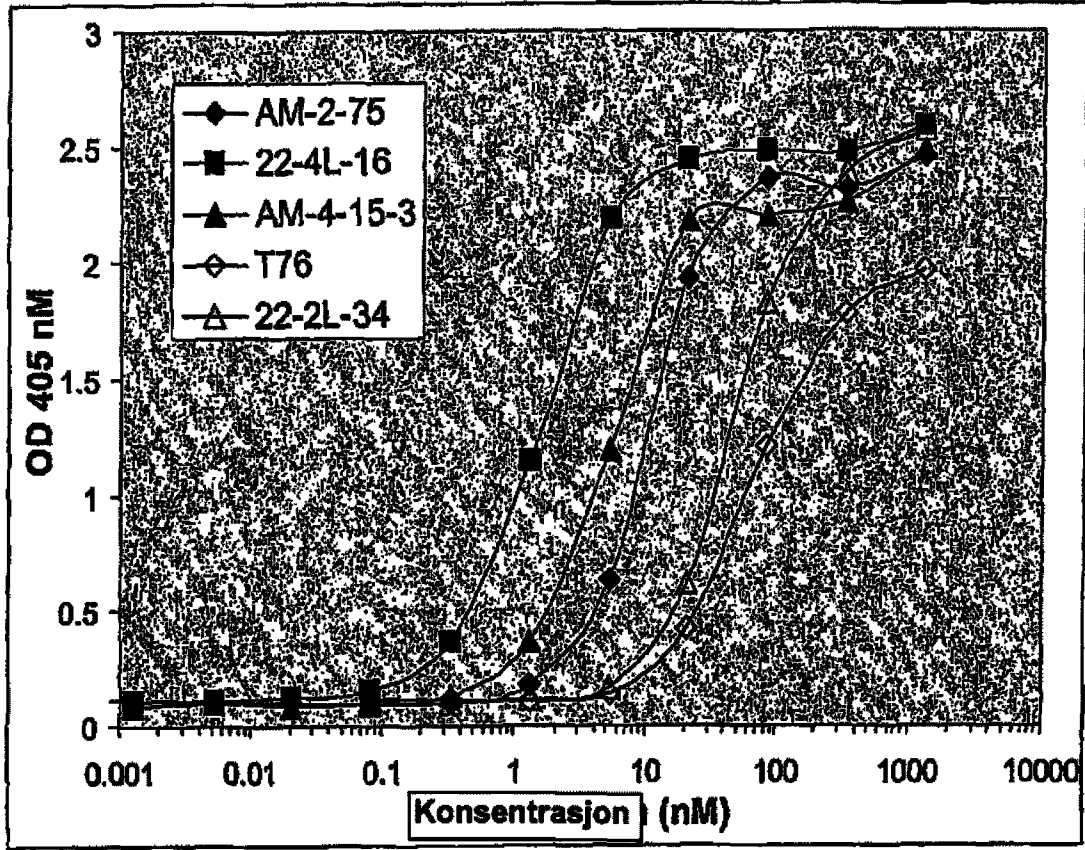
Figur 1



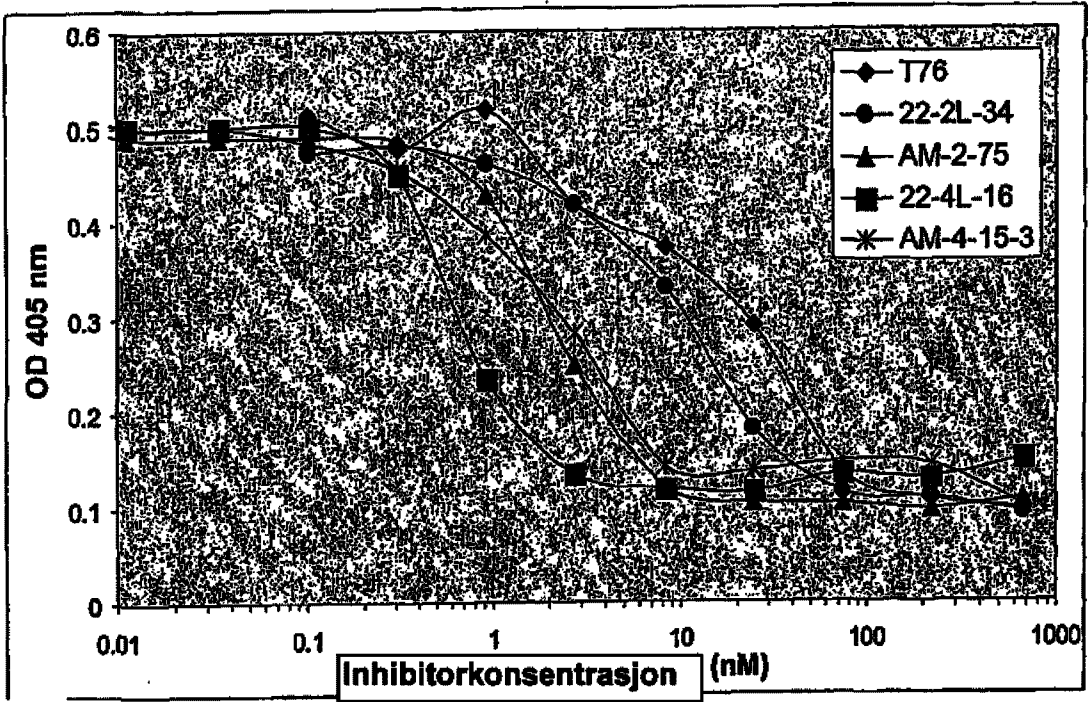
Figur 2



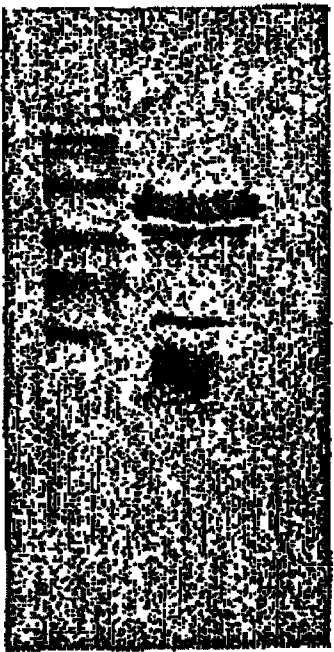
Figur 3



Figur 4



Figur 5



4/19

Figur 6

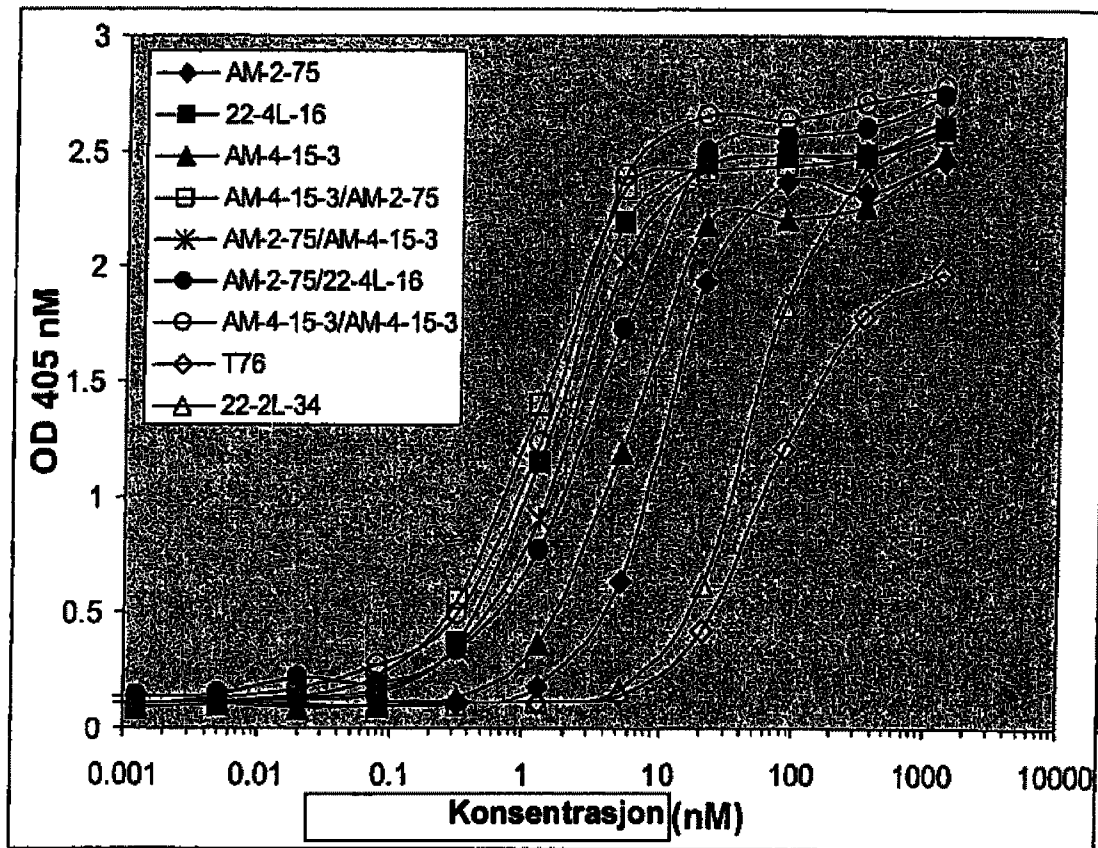
HindIII
 1 aagcttgcac gcaaatctta tttcaaggag acagtcataa tgaataacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt
 M K Y L L P T A A A G L L L
 < pelB-leader

SfiI *NcoI* *NotI* *PstI*
 81 actcgcggcc cagccggcca tggggcctaa taggcggcgg cacaggtgca gctgcaggag tcataatgag ggaccaggt
 L A A Q P A M G P - - A A A Q V Q L Q E S - - G T Q V
 Leader >< VHR#1 > < VHR#2

BstEII
 161 caccgtctcc tcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg cgcacatcca tcatcatcat cattaatgag
 T V S S E Q K L I S E E D L N G A A H H H H H (SEQ ID N° 83)
 >< C-MYC > < His6 >

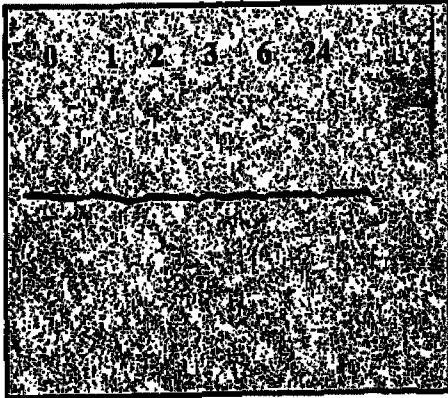
EcoRI
 241 aattcactgg ccg (SEQ ID N° 82)

Figur 7

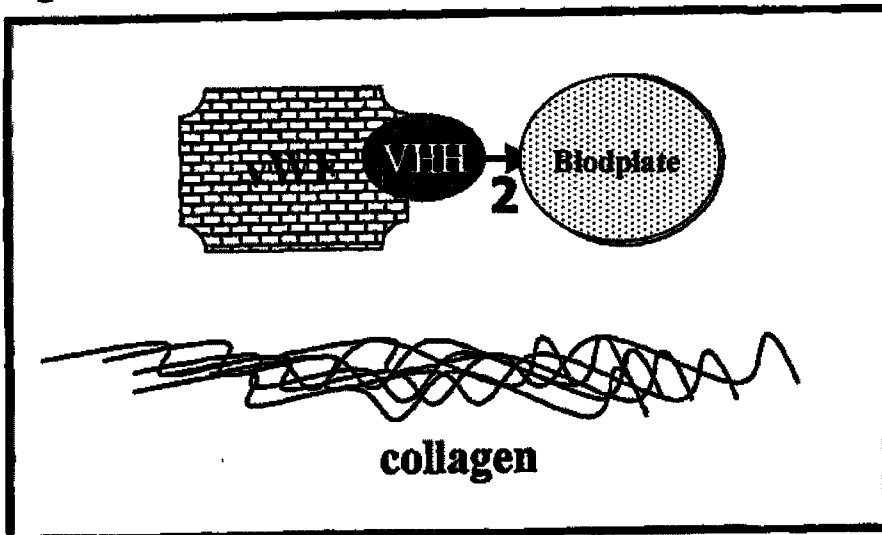




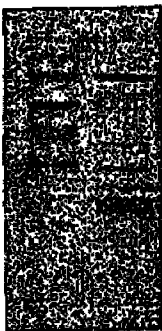
Figur 8



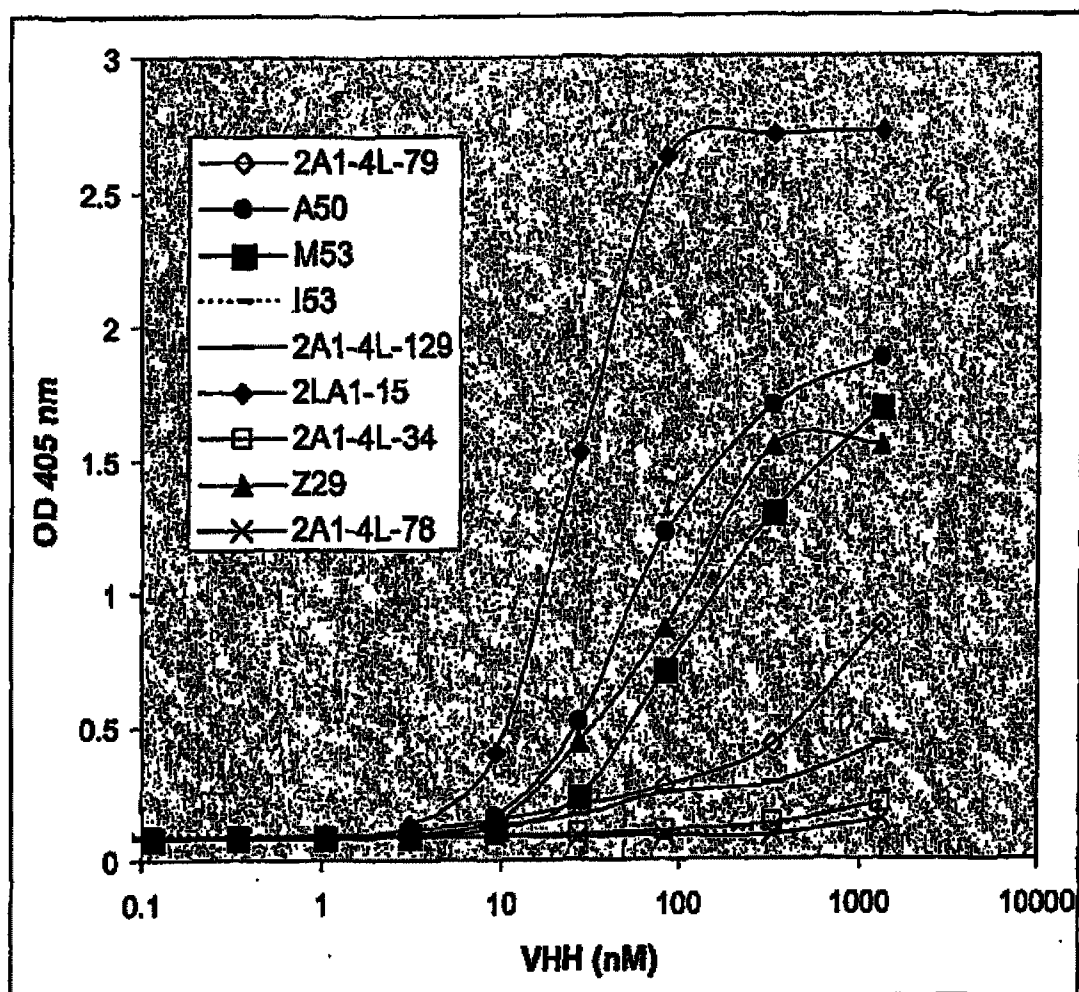
Figur 9



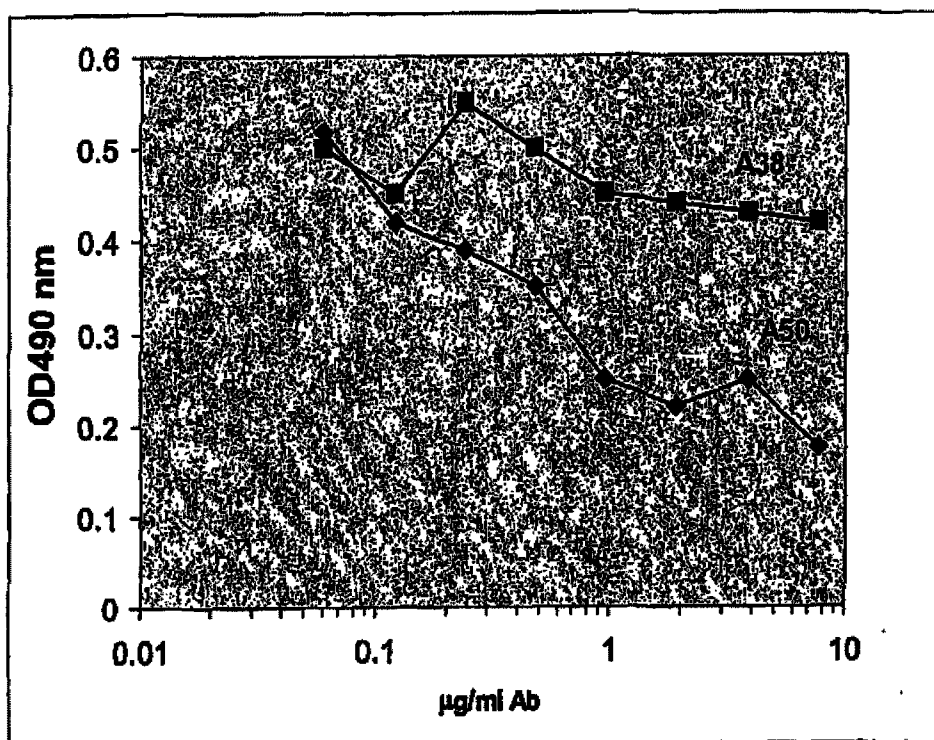
Figur 10



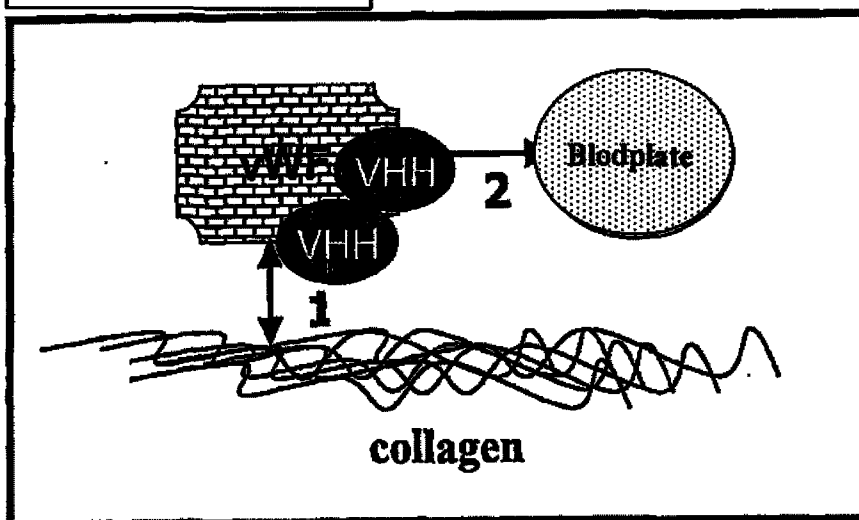
Figur 11



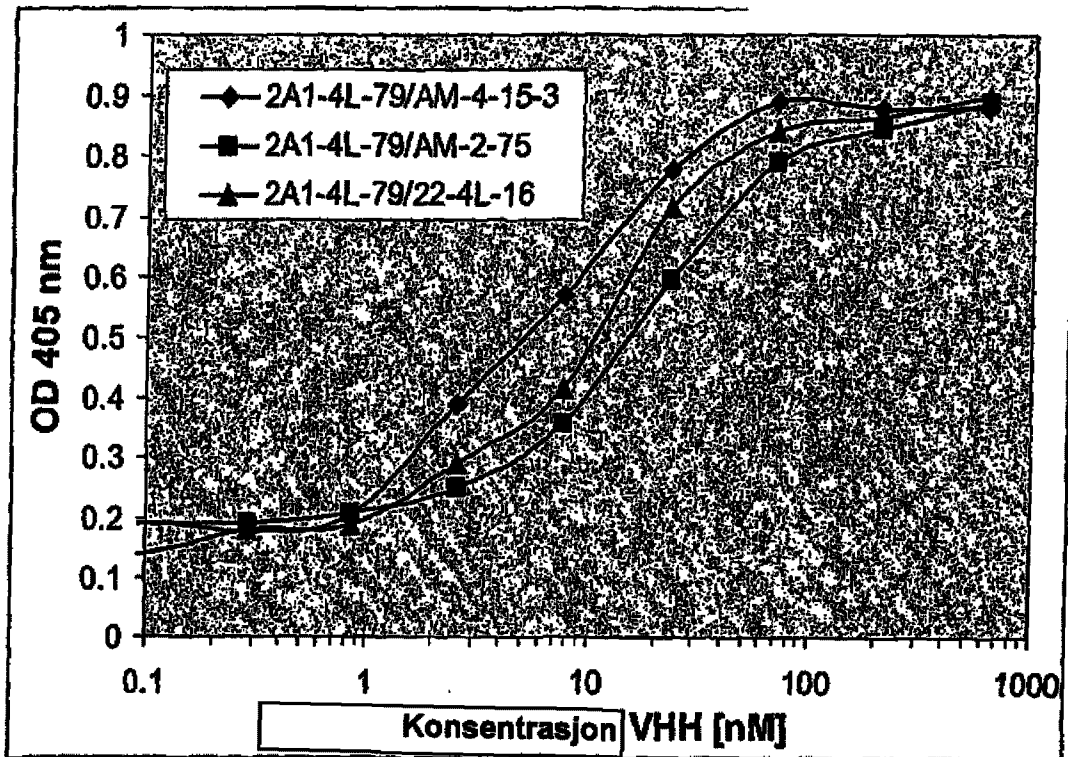
Figur 12



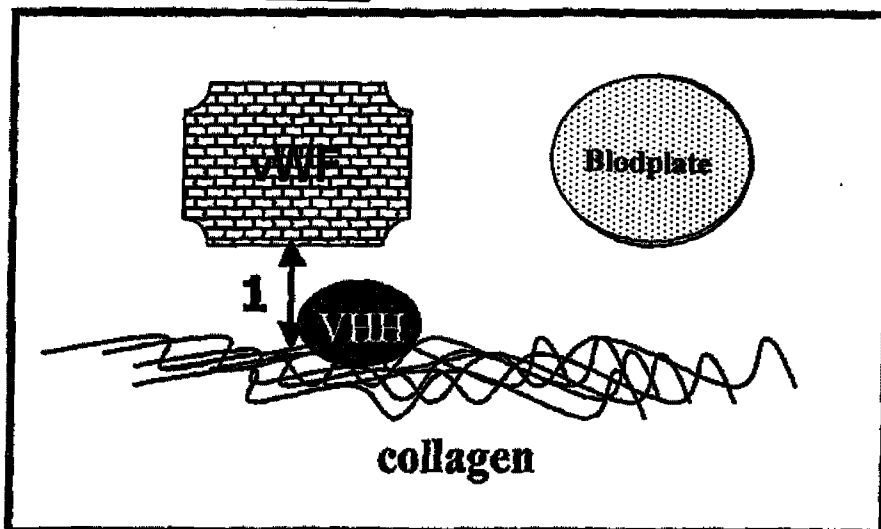
Figur 13



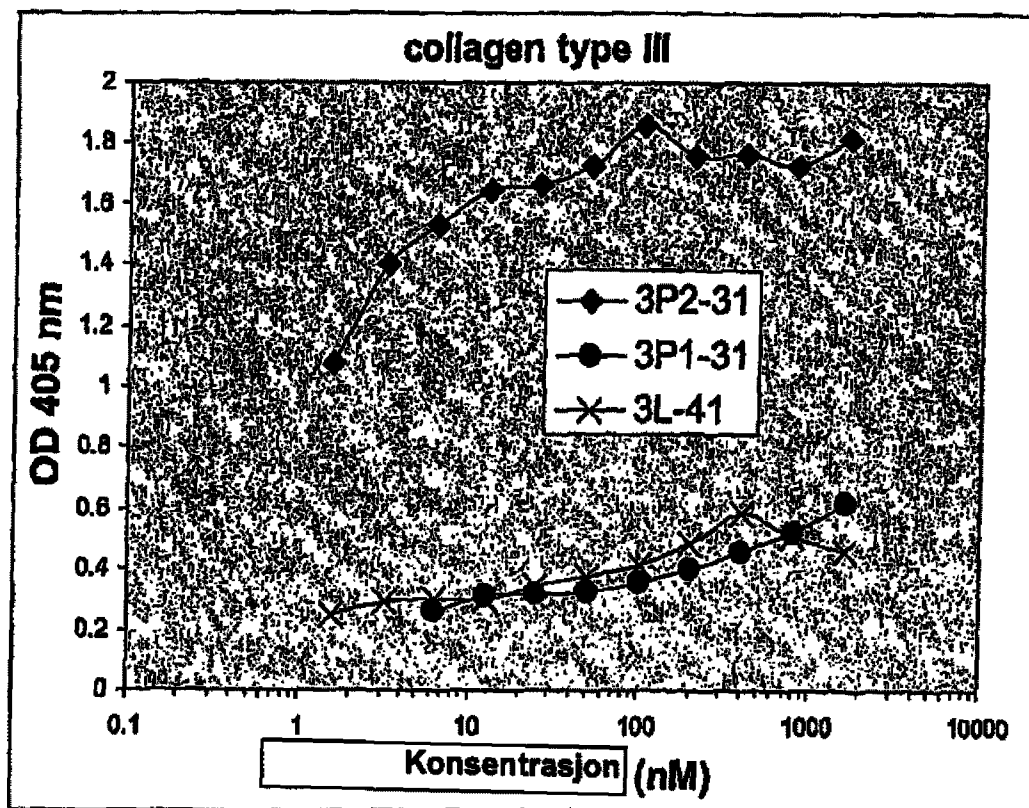
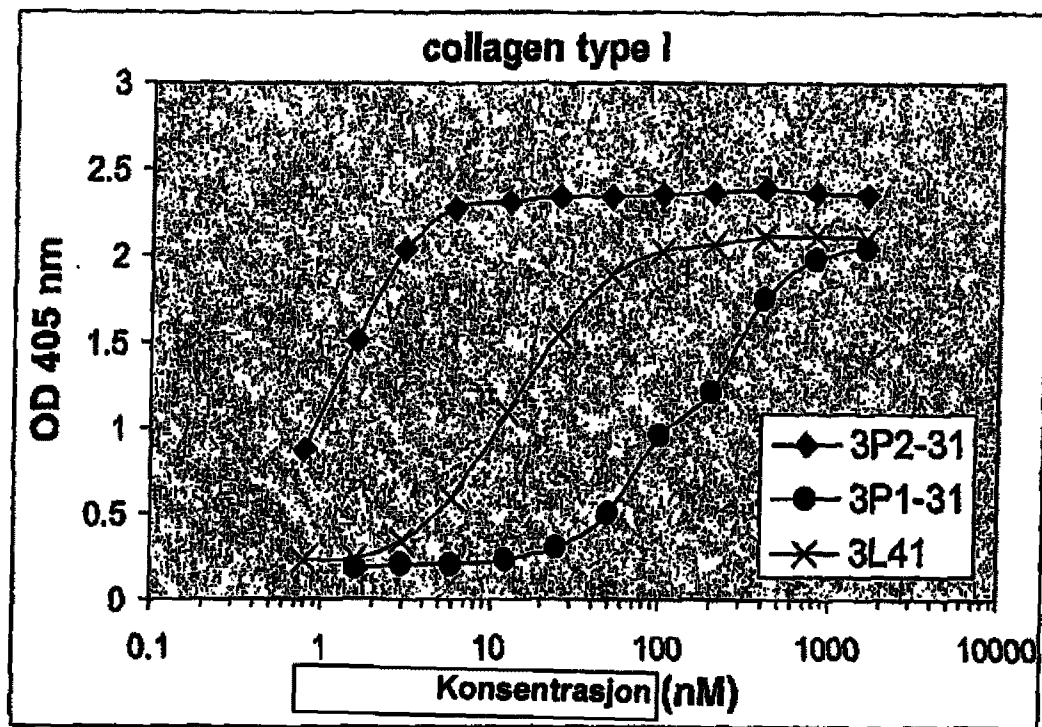
Figur 14



Figur 15

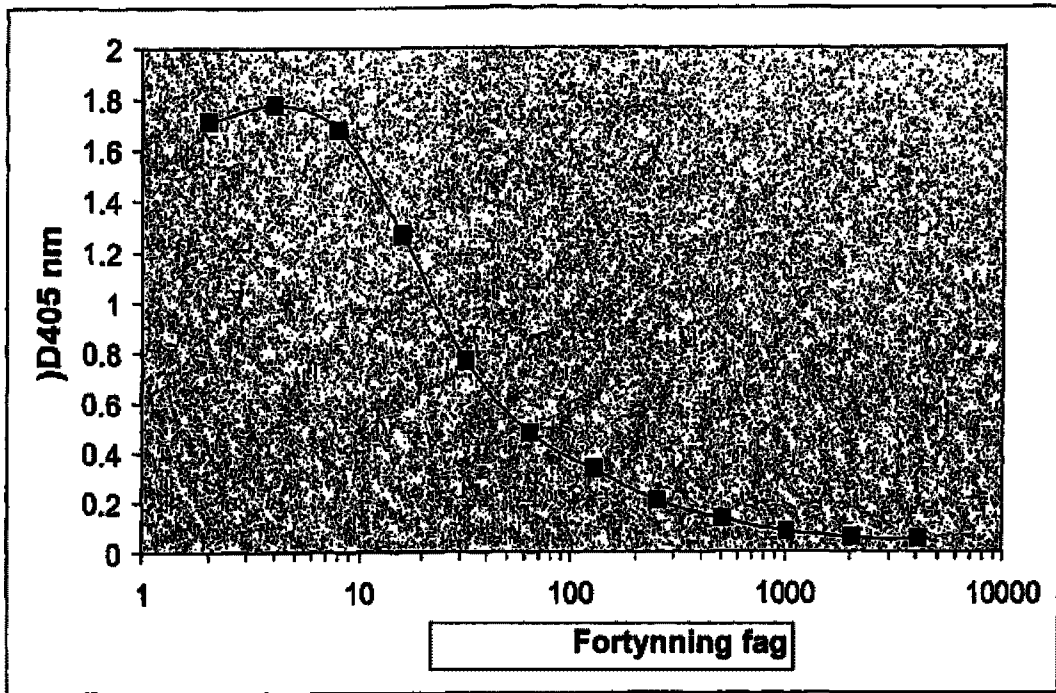


Figur 16

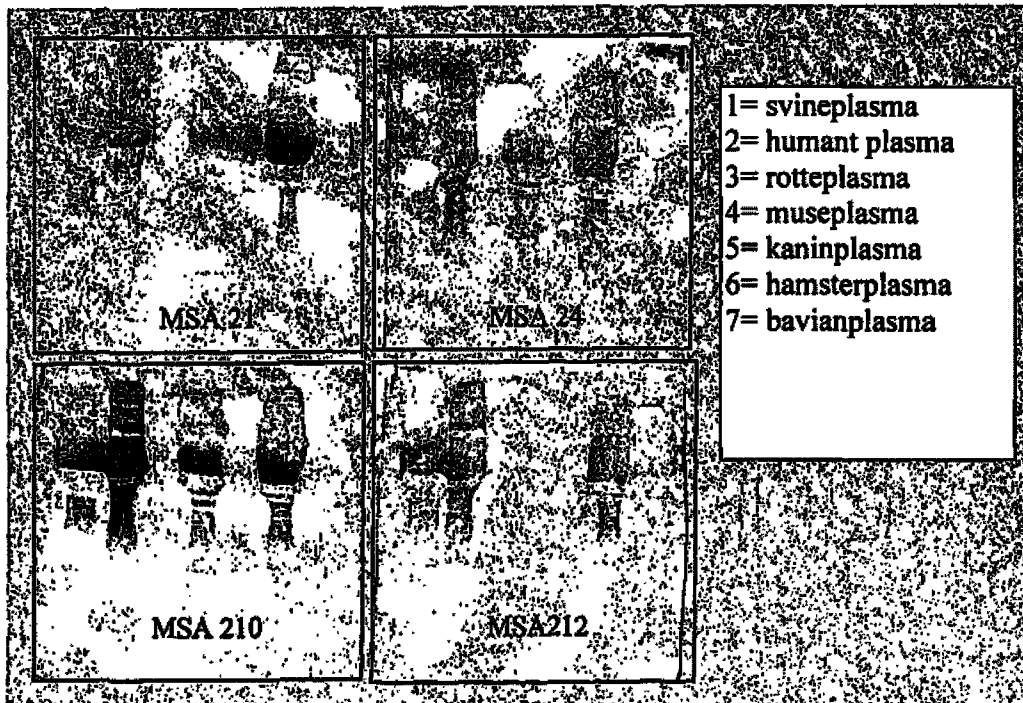


10/19

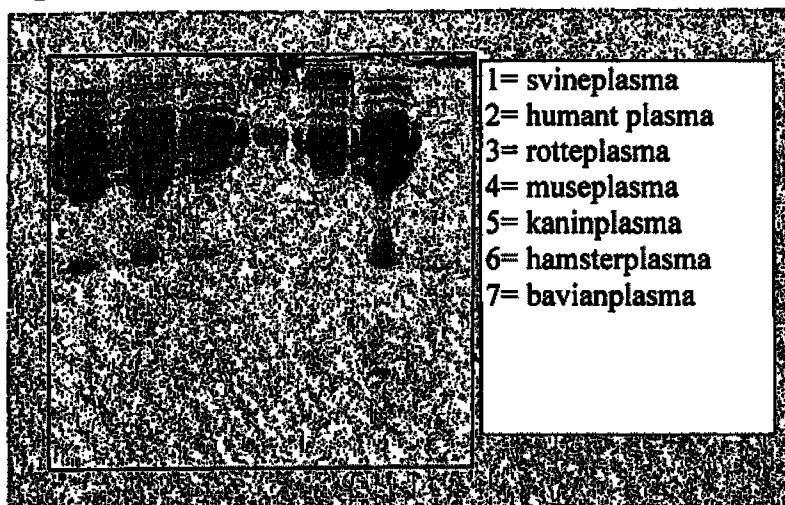
Figur 17



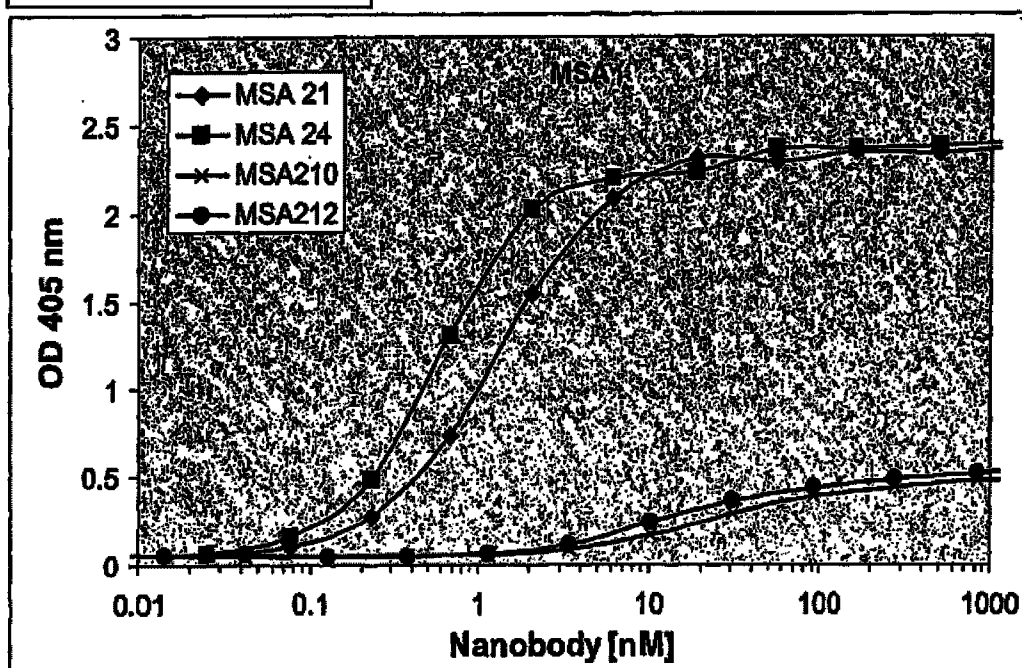
Figur 18



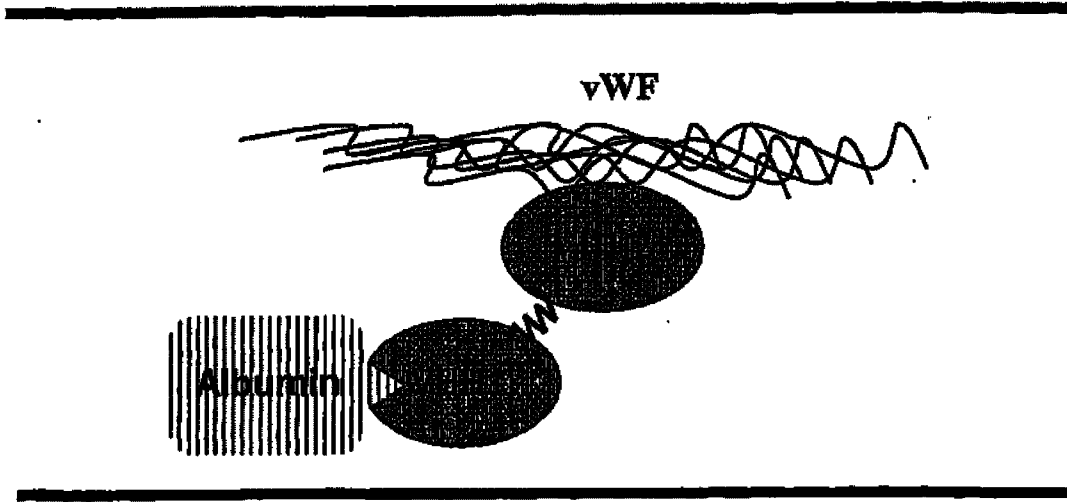
Figur 19



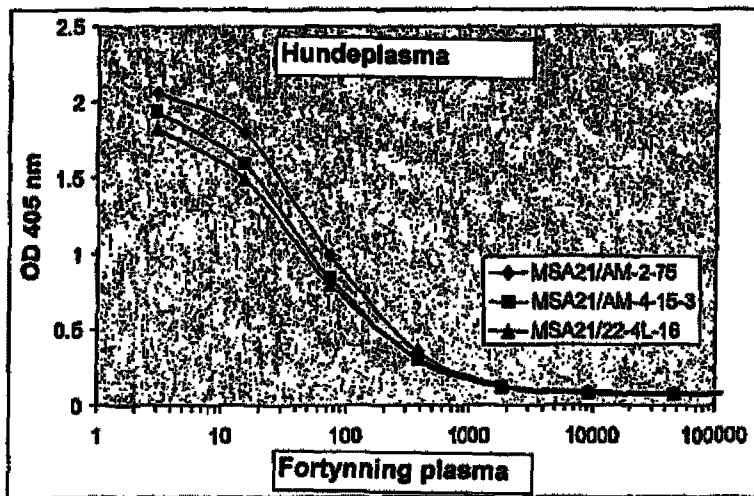
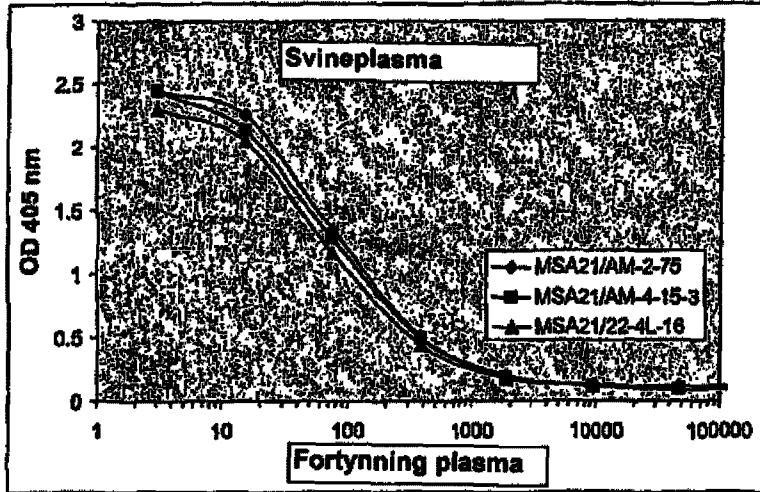
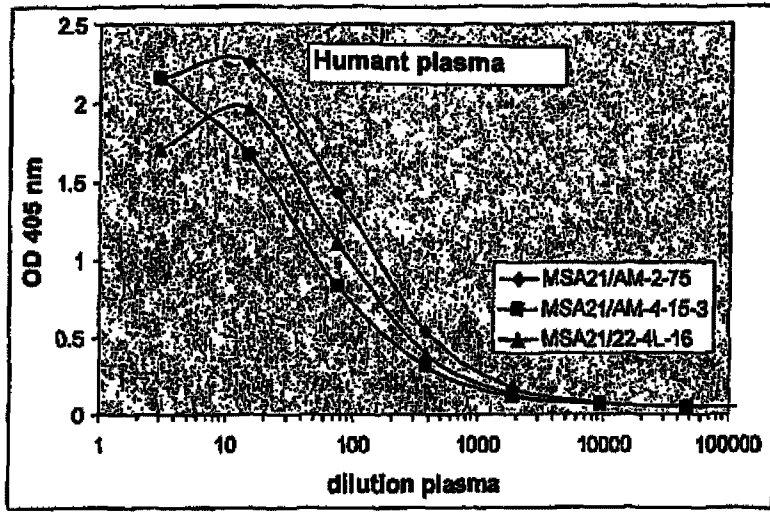
Figur 20



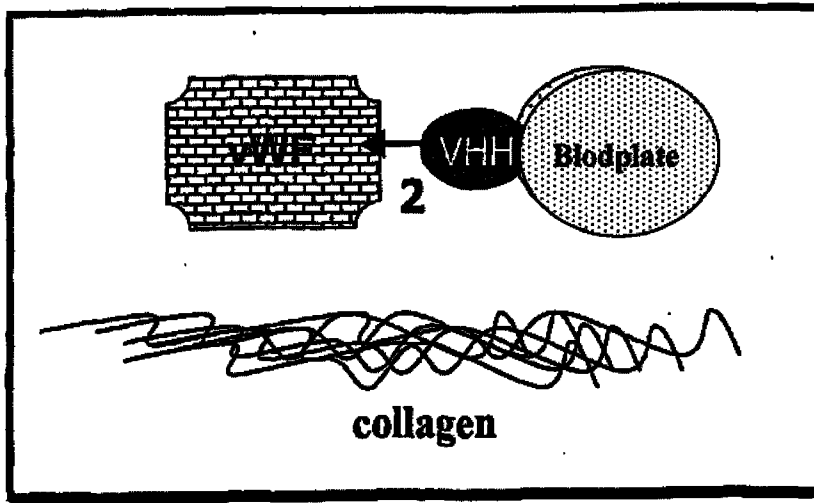
Figur 21



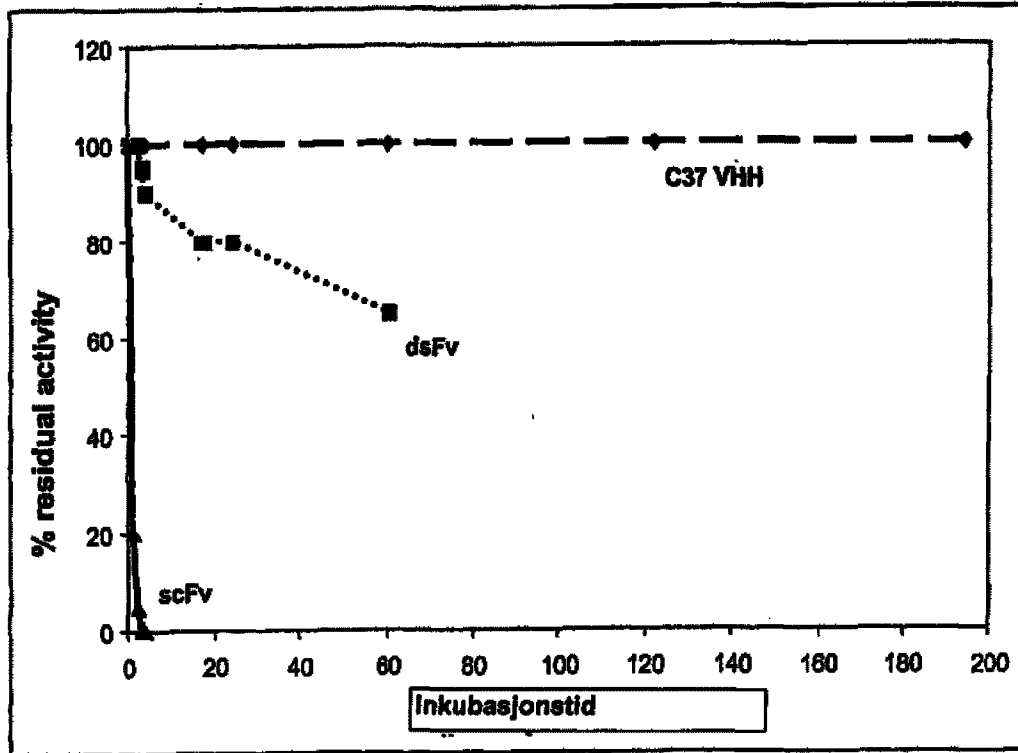
Figur 22

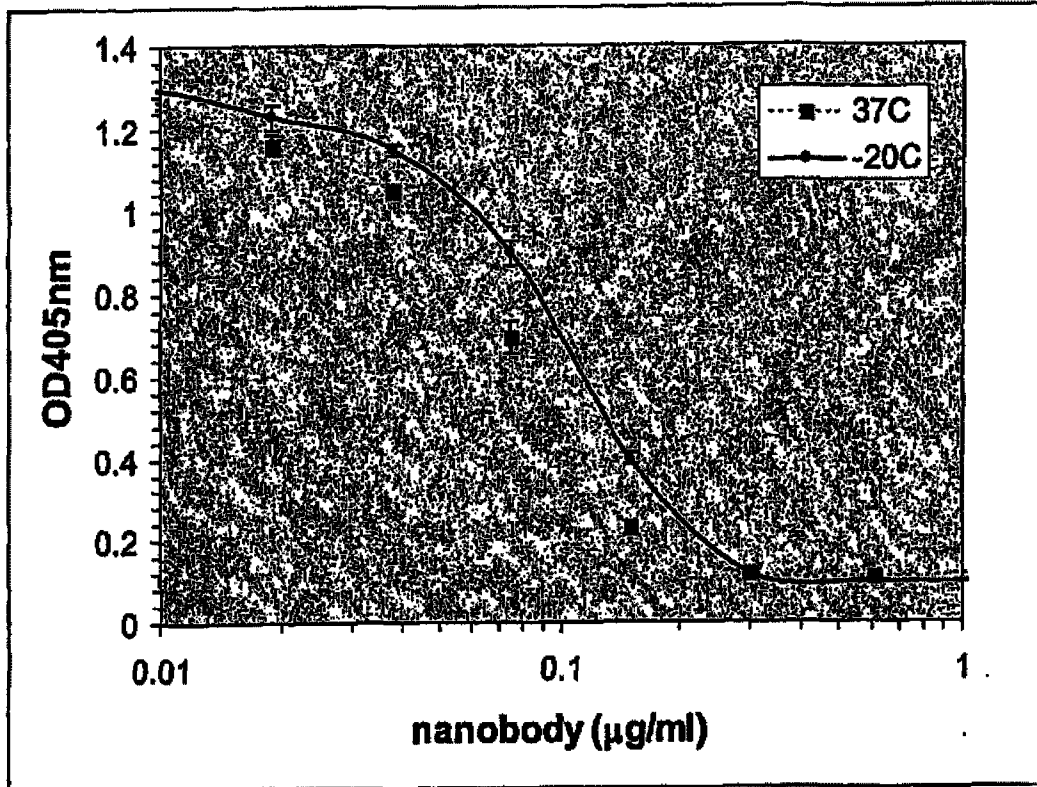


Figur 23

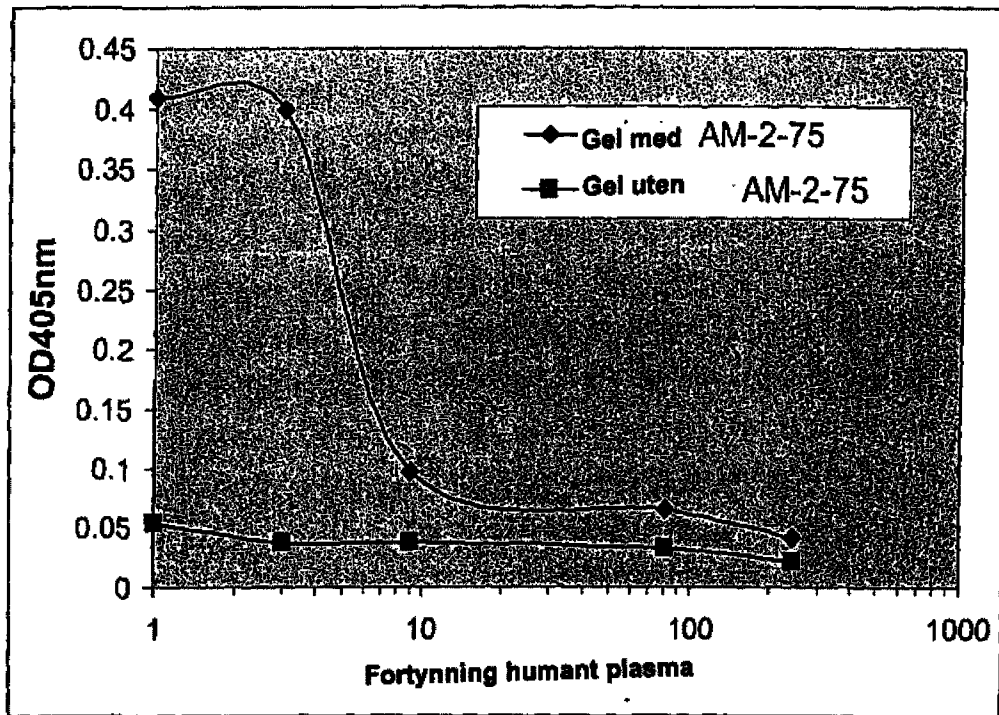


Figur 24



Figur 25

Figur 26



Figur 27

DP-47 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISGSGSTYY

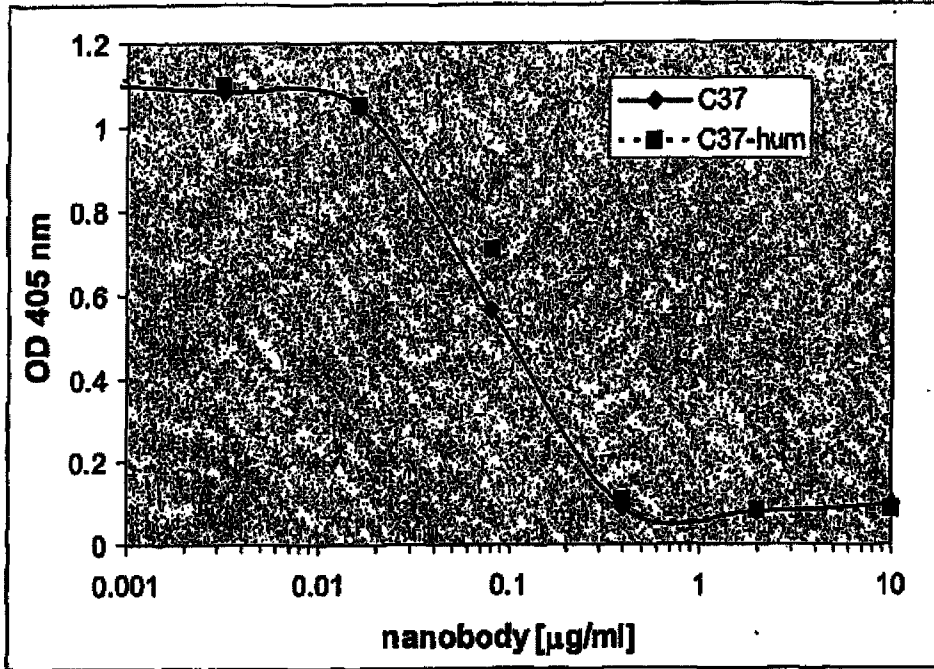
C-37 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFN WYPMS WVRQAPGKGLEWVS TISTYGEPRY-

DP-47 ADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEQ ID N° 84)

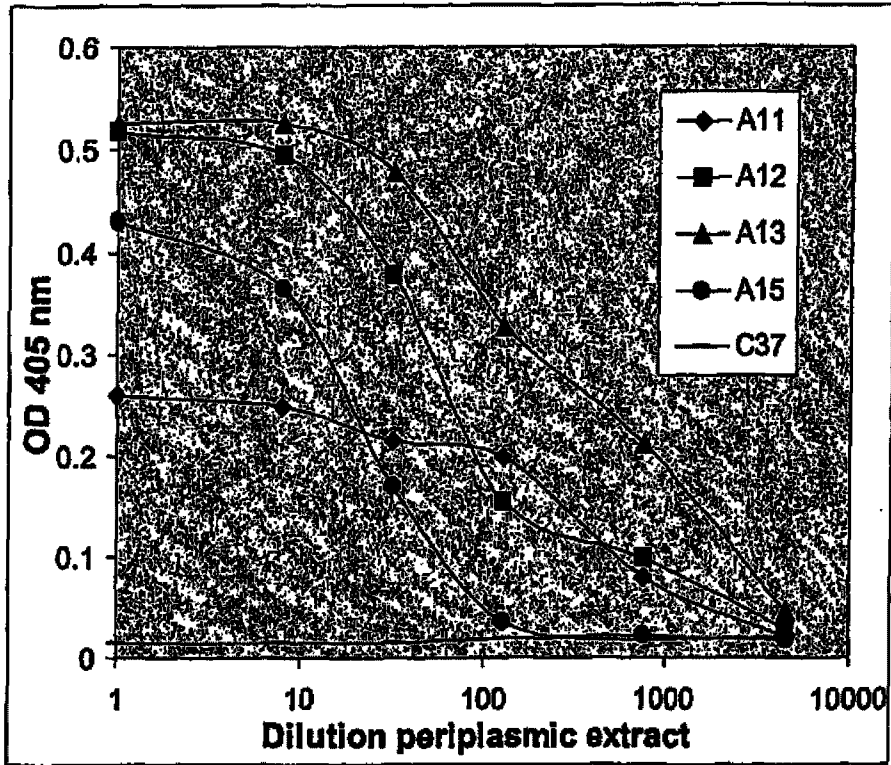
C-37 ADSVKG RFTISRDNANNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAR GAGTSSYLPQRGN WDQGTQVTISS

(SEQ ID N° 85)

Figur 28



Figur 29



Figur 30

