



**NORGE**

(19) NO  
(51) Int Cl.

**C12N 15/10 (2006.01)**  
**A61K 47/48 (2006.01)**  
**C07K 1/107 (2006.01)**  
**C40B 30/04 (2006.01)**  
**C40B 40/02 (2006.01)**  
**C40B 40/08 (2006.01)**  
**C40B 50/06 (2006.01)**  
**G01N 33/569 (2006.01)**  
**G01N 33/68 (2006.01)**

**Patentstyret**

---

(21)	Oversettelse publisert	2012.06.25
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.04.25
(86)	Europeisk søknadsnr	09708496.6
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.02.04
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.12.08
(30)	Prioritet	2008.02.05 GB 0802079 2008.10.08 GB 0818399
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(60)	Utskilt fra	12151953.2
(73)	Innehaver	Medical Research Council, 2nd Floor, David Phillips Building Polaris House, North Star Avenue, Swindon, SN2 1FL, Storbritannia
(72)	Oppfinner	WINTER, Gregory, MRC Laboratory of Molecular Biology Hills road, Cambridge CB2 0QH, Storbritannia HEINIS, Christian, Ecole Polytechnique Federal de Lausanne (EPFL) Laboratory of Therapeutic Peptides and Proteins BCH 5305, CH-1015 Lausanne, Sveits
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

---

(54)	Benevnelse	<b>Metoder og komposisjoner</b>
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-01/05950 B1, WO-A-01/23619 B1, WO-A-02/077182 B1, WO-A-2004/077062 B1, WO-A-2006/078161 B1, WO-A-2006/095345 B1, WO-A-98/36743 B1, ADLER-ABRAMOVICH LIHI ET AL: "Controlled assembly of peptide nanotubes triggered by enzymatic activation of self-immolative dendrimers." CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY 25 MAY 2007, vol. 8, no. 8, 25 May 2007 (2007-05-25), pages 859-862, XP002543654 ISSN: 1439-4227, DWYER M A ET AL: "Biosynthetic Phage Display: A Novel Protein Engineering Tool Combining Chemical and Genetic Diversity" CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 7, no. 4, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 263-274, XP002989574 ISSN: 1074-5521 cited in the application, FICHTER KATYE M ET AL: "Peptide-functionalized poly(ethylene glycol) star polymers: DNA delivery vehicles with multivalent molecular architecture." BIOCONJUGATE CHEMISTRY JAN 2008, vol. 19, no. 1, January 2008 (2008-01), pages 76-88, XP002543651 ISSN: 1043-1802, GUARISE C ET AL: "Fully symmetrical functionalization of multivalent scaffold molecules on solid support" TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 62, no. 50, 11

December 2006 (2006-12-11), pages 11670-11674, XP025002975 ISSN: 0040-4020 [retrieved on 2006-12-11], GUARISE, CRISTIAN; ZAUPA, GIOVANNI; PRINS, LEONARD J.; SCRIMM, PAOLO: "Functionalization of tripodal scaffold molecules on solid support" EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, no. 20, 30 May 2008 (2008-05-30), pages 3559-3568, XP002543655, JESPER LAURENT ET AL: "Selection of optical biosensors from chemisynthetic antibody libraries." PROTEIN ENGINEERING, DESIGN & SELECTION : PEDS OCT 2004, vol. 17, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 709-713, XP002535021 ISSN: 1741-0126 cited in the application, KATHER ET AL: "A Stable Disulfide-free Gene-3-protein of Phage fd Generated by In vitro Evolution" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 354, no. 3, 2 December 2005 (2005-12-02), pages 666-678, XP005165892 ISSN: 0022-2836 cited in the application, KLOK H-A ET AL: "STAR-SHAPED FLUORESCENT POLYPEPTIDES" JOURNAL OF POLYMER SCIENCE, INTERSCIENCE PUBLISHERS, XX, vol. 39, no. 10, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1572-1582, XP001061864, RANGANATHAN D ET AL: "DESIGN AND SYNTHESIS OF AB3-TYPE (A=1,3,5-BENZENETRICARBONYL UNIT; B=GLU DIOME OR GLU7 OCTA OME) PEPTIDE DENDRIMERS: CRYSTAL STRUCTURE OF THE FIRST GENERATION" BIOPOLYMERS, NEW YORK, NY, US, vol. 54, no. 4, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 289-295, XP001040555 ISSN: 0006-3525, SCHMUCK CARSTEN ET AL: "Solid phase synthesis of a prototype of a new class of biomimetic receptors for anionic carbohydrates." ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY 7 MAR 2007, vol. 5, no. 5, 7 March 2007 (2007-03-07), pages 787-791, XP002543652 ISSN: 1477-0520, SUN SHUGUANG ET AL: "Thermodynamic studies on the recognition of flexible peptides by transition-metal complexes" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON.; US, vol. 41, no. 6, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 1584-1590, XP002509071 ISSN: 0022-3263 [retrieved on 2002-02-22], TIMMERMAN P ET AL: "Rapid and quantitative cyclization of multiple peptide loops onto synthetic scaffolds for structural mimicry of protein surfaces" CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY, WILEY VCH, WEINHEIM, DE, vol. 6, no. 5, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 821-824, XP002378236 ISSN: 1439-4227 cited in the application, TROUCHE NATHALIE ET AL: "Small multivalent architectures mimicking homotrimers of the TNF superfamily member CD40L: delineating the relationship between structure and effector function." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 7 NOV 2007, vol. 129, no. 44, 7 November 2007 (2007-11-07), pages 13480-13492, XP002543650 ISSN: 0002-7863, VAN DEN HOUT KELLY P ET AL: "Tuning the stacking properties of C3-symmetrical molecules by modifying a dipeptide motif." CHEMISTRY (WEINHEIM AN DER BERGSTRASSE, GERMANY) 2007, vol. 13, no. 29, 2007, pages 8111-8123, XP002543649 ISSN: 0947-6539, WOIWODE T F ET AL: "Synthetic compound libraries displayed on the surface of encoded bacteriophage" CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 10, no. 9, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 847-858, XP002287083 ISSN: 1074-5521 cited in the application

**Tittel: Metoder og komposisjoner****Beskrivelse****OPPFINNELSENS OMRÅDE**

5

Oppfinnelsen vedrører modifikasjon og begrensning av polypeptider, nærmere bestemt genetisk kodede polypeptider i komplekser med nukleinsyrer som koder for dem slik som i sammenheng med fagdisplay.

10

**OPPFINNELSENS BAKGRUNN**

15

Utvikling av molekyler med høy affinitet og spesifisitet for biologiske mål er et sentralt problem innen kjemisk, biologisk og farmasøytisk vitenskap. Nærmere bestemt så er bindingsligander viktige for å lage medikamenter som kan intervensere med biologiske prosesser. Dannelse av ligander som binder seg til en valgt målligand involverer vanligvis en prosess som danner flere putative bindingsmolekyler og å teste nevnte molekyler for deres bindingsegenskaper.

20

Mens biologiske *in vitro* seleksjonsteknikker effektivt ble anvendt for isolering av store biopolymere strukturer slik som antistoffer, har de hittil vært mindre praktiske for isolering av småmolekylmedikamenter. Biologiske *in vitro* seleksjonsteknikker er generelt begrenset til biologiske polymerer slik som polypeptider, RNA eller DNA. Korte biopolymerer som for eksempel peptider, kan også binde seg til biologiske mål, men de kan lide av konformasjonell fleksibilitet og kan ha tendens til proteolytisk degradering i kroppsvæsker. I tillegg er bindingsaffiniteter til korte, lineære peptider ofte svake. Forskjellige sirkulariseringsstrategier er kjente for å innskrenke genetisk kodede små peptidbiblioteker. Fagfremviste peptidrepertoarer er for eksempel kjent for å sirkulariseres ved oksideringen av to flankerende cysteinrester. mRNA-kodede sykliske peptidbibliotek er kjent for å dannes ved å koble det N-terminale aminet og et lysin til peptidet med et kjemisk kryssbindende reagens. Denne strategien ble anvendt for isolering av redoks-insensitive makrosykluser som binder seg til signaleringsproteinet Gail (Millward, S. W. et al., ACS Chem. Biol., 2007). Forskjellige strategier er også kjent for anvendelse til å inkorporere ikke-naturlige byggeblokker inn i genetisk kodede polypeptidbiblioteker for å utvide mangfoldet til bibliotekene, eller for å sette inn egenskaper som ikke kan

35

tilveiebringes av naturlige aminosyrer. Imidlertid tillot strategiene kun tilsettelse av et begrenset antall små organiske tilføyelser til lineært kodede polypeptider. Frankel, A. et al., hadde for eksempel inkorporert ikke-naturlige aminosyrer inn i naturlige polypeptider som ble kodet av mRNA display (Frankel, A. et al., Chem. Biol, 2003). Jaspers L. et al. hadde kjemisk koblet et fluoriserende reportertermolekyl til en hypervariabel sløyfe i et antistoffrepertoar fremvist på fag, og valgt dette repertoaret til antigenbinding (Jaspers, L., et al., Prot. Eng., 2004). Dwyer, M. A. et al. hadde forent syntetiske peptider til et repertoar av fagfremviste peptider ved nativ kjemisk ligering for genereringen av et proteaseinhibitorbibliotek som inneholdt en ikke-naturlig aminosyre (Dwyer, M. A. et al., Chemistry & Biology, 2000). Små organiske molekyler er også blitt koblet til mRNA-kodede kombinatoriske peptidrepertoar. Forskningsgruppen til Roberts, R. W. festet en penicillindel til en bestemt posisjon i et mRNA-fremvist peptidbibliotek for å velge inhibitorer av det *Staphylococcus aureus* penicillinbindende proteinet 2a (Li, S. and Roberts, W. R., Chem. & Biol., 2003).

For å bruke *in vitro* seleksjon på kombinasjonsforbindelsesbiblioteker som har flere forskjellige molekyllarkitekturer (f. eks. forgrenede molekyler) og som blir dannet av ikke-naturlige byggeblokker, er det foreslått flere forskjellige fremgangsmåter. Forskjellig fra biologiske *in vitro* seleksjonsfremgangsmåter anvender disse fremgangsmåtene kjemiske strategier for å feste DNA-tagger til små organiske molekyler. Brenner S. og Lerner R. A. foreslo en prosess for parallell kombinasjonssyntese for å kode for forskjellige individuelle medlemmer av et stort bibliotek med kjemikalier med unike nukleotidsekvenser på kuler (Brenner, S. and Lerner, R. A., PNAS, 1992). Etter at den kjemiske delen er bundet til målet, så avkodes den genetiske koden ved å sekvensere nukleotidtaggen. Liu D. R. og medarbeidere konjugerte en mindre samling av organiske molekyler til DNA-oligonukleotider og utførte affinitetsseleksjoner med forskjellige antigen (Doyon, J. B. et al., JACS, 2003). Neri D. og medarbeider genererte store repertoarer av molekyllpar ved selvsammenstilling av mindre DNA-kodede kjemiske sub-biblioteker gjennom hybridisering av to DNA-tråder (Melkko. S. et al., Nature Biotechnol., 2004). Fremgangsmåten ble vellykket anvendt til affinitetsmetning av små molekylligander. Halpin D. R. og Harris P. B. utviklet en strategi for *in vitro* evolusjonen av kombinasjon kjemiske biblioteker som involverer oppformering av valgte forbindelser for å utføre flere seleksjonsrunder (Halpin, D. R. og Harbury, P. B., PLOS Biology, 2004).

Woiwode T. F. et al. festet biblioteker av syntetiske forbindelser for å belegge proteiner i bakteriofagpartikler slik at identiteten til den kjemiske strukturen er spesifisert i genomet til fagen (Woiwode, T. F., Chem. & Biol., 2003). Alle disse strategiene som bruker DNA-spesifiserte kjemiske forbindelser har vært vist å  
5 være effektive i modelleksperimenter og noen har til og med gitt nye små molekylbindere. Imidlertid er det klart at kodingen av store forbindelsesbiblioteker og oppformeringen av valgte forbindelser er mye mer krevende enn de ekvivalente fremgangsmåtene i biologiske seleksjonssystemer

10 Jespers et al (2004 Protein engineering design and selection, volum 17, nr 10, side 709-713) beskriver seleksjonen av optiske biosensorer fra kjemisyntetiske antistoffbiblioteker. Dette dokument vedrører tilføyelsen av ett fluorescerende reportertermolekyl gjennom den hypervariable sløyfen til et antistoffrepertoar fremvist på fagen. Nærmere bestemt beskriver dette dokument koblingen av et  
15 fluorescerende reportertermolekyl på en hypervariable sløyfe (komplementaritet som bestemmer region eller CDR) til et syntetisk antistoffrepertoar. Det fluorescerende reportertermolekylet er koblet med en enkel kovalent binding til en artifielt introdusert cysteinrest i den hypervariable sløyfen. En en-til-en-tilføyelse utføres. Cysteinrester på fagpartiklene ble redusert med DTT, og  
20 overskudd av reduksjonsmidlet ble fjernet med konvensjonell polyetylenglykol (PEG)-presipitering som er velkjent i fagfeltet.

Dwyer *et al* omtaler biosyntetisk fagdisplay som beskriver et nytt konstruksjonsverktøy for protein som kombinerer kjemisk og genetisk mangfold.  
25 Dwyer et al (Chem Biol 2000, volum 7, nr 4, side 263-274) beskriver den kjemiske ligeringen av et syntetisk peptid som omfatter de hovedstrukturelle restene til et protein av forbindelsesledd med proteasesekvenser som hver har et konstant segment som inkorporerer en unaturlig aminosyre. Det syntetiske peptidet som omfatter den ikke-naturlige aminosyren ble enkelt tilføyd med  
30 nativ kjemisk ligering og resulterte i kobling av de to peptidfragmentene sammen. Ingen koblingsforbindelse blir beskrevet. Ingen festing av små molekyl er beskrevet. Ingen begrensning eller konformasjonsbegrensning av det resulterende polypeptidet ble oppnådd. Ingen kovalent binding av bestemte deler til polypeptidkjeden er beskrevet.

35 Forskjellige forskningsgrupper har tidligere bundet sammen polypeptider med cysteinrester til en syntetisk molekylstruktur (Kemp, D. S. and McNamara, P. E.,

J. Org. Chem, 1985; Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005). Meloen og medarbeidere har anvendt tris(brommetyl)benzen og relaterte molekyler for rask og kvantitativ ringslutning av flere peptidsløyfer på syntetiske skaffoll for strukturell etterligning av proteinoverflater (Timmerman, P. et al.,  
5 ChemBioChem, 2005). Fremgangsmåter for genereringen av kandidatmedikamentforbindelser hvor nevnte forbindelser genereres ved å koble cysteininneholdende polypeptider til et molekylært skaffold som for eksempel tris(brommetyl)benzen, er omtalt i WO 2004/077062 og WO 2006/078161. Fremgangsmåter tilveiebrakt i WO 2004/077062 og WO 2006/078161 er basert på å ta prøver av individuelle forbindelser, for eksempel i en  
10 screeningsprosedyre. Screening av individuelle forbindelser eller små sett av forbindelser er arbeidsomt og kan være dyrt hvis et stort antall forbindelser analyseres. Antallet forbindelser som kan analyseres med screeningsanalyser, overskrider generelt ikke flere tusen. Videre er reaksjonsbetingelsene for å binde et cysteininneholdende peptid til et halometylinneholdende skaffold som for  
15 eksempel tris(brommetyl)benzen, ikke egnet til å modifisere et genetisk kodet cysteininneholdende peptid, omtalt i WO 2004/077062.

WO2004/077062 omtaler en fremgangsmåte for å selekttere en  
20 kandidatmedikamentforbindelse. Nærmere bestemt omtaler dette dokumentet forskjellige skaffoldmolekyler med et ytterligere molekyl for å danne minst to koblinger mellom skaffoldet og det ytterligere molekylet i en koblingsreaksjon. Denne fremgangsmåten lider av mange begrensninger. For det første er den basert på anvendelsen av syntetiske peptider og *in vitro* kjemiske reaksjoner i separate rør. På grunn av dette er den arbeidskrevende. Det finnes ingen  
25 muligheter for å automatisere eller å anvende fremgangsmåten til screeningen av mange peptidvarianter uten manuelt å produsere hver variant ved å utføre flere parallelle uavhengige reaksjoner. Det nevnes ikke genetisk kodet mangfold i dette dokument og det er absolutt ingen omtale av bruk av genetisk kodede fagbiblioteker. Faktisk betyr reaksjonsbetingelsene omtalt i dette dokumentet at  
30 det ville være vanskelig eller umulig å utføre reaksjonene omtalt på fagpartikler.

WO2006/078161 omtaler bindingsforbindelser, immunogene forbindelser og mimetiske peptider. Dette dokumentet omtaler den artfisielle syntesen av  
35 forskjellige samlinger av peptider tatt fra eksisterende proteiner. Disse peptidene blir så kombinert med et konstant syntetisk peptid som har noen

aminosyreforandringer, en øket mulighet for å finne den ønskede bindingsaktiviteten tilveiebringes. Figur 7 i dette dokumentet viser en skjematisk representasjon av syntesen av forskjellige peptidkonstruksjoner. Det er ingen omtale av genetisk kodede peptidbiblioteker i dette dokumentet. Det er ingen omtale av anvendelsen av fagfremvisningsteknikker i dette dokument. Dette dokument omtaler en prosess som betraktes som å være ikke-kompatibel med fagfremvisning. For eksempel resulterer kjemien som er fremsatt i dette dokumentet, sannsynligvis i at koblingsmolekylet reagerer med fagkappen. Det er en risiko for at det kunne kryssbinde med fagpartiklene. Det er sannsynlig at fagpartiklene ville være inaktive (f.eks. ville miste deres infektivitet) hvis de utsettes for kjemien som beskrives. Dette dokumentet er fokusert på manipuleringen av forskjellige syntetiske peptider i uavhengige kjemiske konjugeringsreaksjoner.

15 Millward et al (2007 Chemical Biology, volum 2, nr 9, side 625-634) omtaler utformingen av sykliske peptider som binder proteinoverflater med antistofflignende affinitet. Dette dokumentet omtaler ringslutning av forskjellige peptider produsert fra et genetisk kodet bibliotek. Polypeptidene ringsluttes gjennom reaksjon mellom en kjemisk kryssbinder og det N-terminale aminet og et amin til et lysin i polypeptidet. I dette dokumentet er det genetisk kodende biblioteket et mRNA-displaybibliotek. Dette dokument omtaler ikke tilføyelsen av noen koblingsforbindelse til de resulterende polypeptidene. Kjemien omtalt i dette dokumentet er ringslutning gjennom reaksjon mellom en kjemisk kryssbinder og det N-terminale aminet og et amin til et lysin tilveiebrakt i polypeptidet. Ringslutningsreaksjonen utføres i en 50 millimolar fosfatbuffer ved pH 8 ved tilsettelsen av DSG (1 mg pr. ml i DMF). I beste fall omtaler dette dokumentet brodannelsen mellom to deler av en polypeptidkjede via en kryssbindende del for å tilveiebringe et syklisk peptid.

30 US2003/0235852 omtaler nukleinsyre-peptidfremvisningsbiblioteker som inneholder peptider med unaturlige aminosyre rester og fremgangsmåter for å lage disse ved å anvende peptidmodifiserende midler. Med andre ord omtaler dette dokumentet genetisk kodede polypeptidbiblioteker som inneholder enten en unaturlig aminosyre eller en aminosyre hvor en unaturlig byggeblokk (f.eks. penicillin) blir posttranslasjonelt tilføyd i en kjemisk reaksjon. Dette dokumentet er fokusert på kjente fremgangsmåter for å assosiere et translatert peptid med

35

nukleinsyren som koder for det. Ytterligere problemer som er ivaretatt av dette dokumentet, er hvordan inkorporere unaturlige aminosyrer inn i peptidet. Det oppnås i prinsippet ved anvendelsen av suppressor-tRNA for å inkorporere unaturlige aminosyrer som respons på amber-/okre-/opalkodon som er velkjente i fagfeltet. I andre mindre viktige utførelsesformer blir unaturlige aminosyrer dannet posttranslasjonelt ved behandling av det translaterede peptidet med et "peptidmodifiserende middel". Dette midlet hjelper vanligvis til med å forandre en eksisterende aminosyrerest til en unaturlig aminosyrerest, eller på annen måte gjør at det er funksjonelt reaktivt eller mottagelig for tilføyelsen av en ytterligere kjemisk del. Spesifikt så forklarer dette dokumentet den posttranslasjonelle konjugeringen av en cysteinrest i polypeptidet av interesse til betalaktamantibiotisk 6-bromacetyl-penicilaminsyre. Dette resulterer i konjugeringen av denne penicillinanalogen på polypeptidet av interesse via en enkel binding til cysteinrestsidekjeden. Ingen flere koblinger av molekylet som blir ligert på polypeptidet, blir omtalt. Ingen konformasjonsbegrensning av polypeptidet blir beskrevet. Ingen peptidsløyfer eller noen andre komplekse tertiære strukturer dannes med de fremgangsmåtene omtalt i dette dokument, det er kun en måte for å tilføye en enkel ytterligere molekylgruppe til et polypeptid via en enkel binding. Konvensjonell konjugasjonskjemi anvendes for å utføre modifikasjonene til polypeptidene i dette dokument.

#### OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tillater på en gunstig måte kombinasjonen av genetisk kodet mangfold, nærmere bestemt genetisk kodede polypeptidbiblioteker, med kjemisk modifikasjon og konformasjonsbegrensninger.

Videre tilveiebringer teknikkene som er omtalt her, koblingen av en koblingsforbindelse til et polypeptidmolekyl med minst tre kovalente bindinger. Dette tilveiebringer fordelene med konformasjonsbegrensning til polypeptidet, nærmere bestemt konformasjonsbegrensning på minst to segmenter av polypeptidet med hensyn til hverandre. I motsetning til dette, vil anvendelsen av en koblingsforbindelse som lager kun to kovalente bindinger, begrense kun et enkelt segment av polypeptidet.

Fordeler med oppfinnelsesflyten fra disse tekniske egenskapene, for eksempel på grunn av deres trippelbundne konstruksjon, har de konjugerte molekylene to

eller flere peptidsløyfer som kan interagere med et mål. Med flere bindingssløyfer kan høyere bindingsaffiniteter fremskaffes enn med molekyler som kun har en enkel peptidsløyfe.

5 I tillegg er interaksjonsoverflaten til et molekyl ifølge oppfinnelsen med to eller flere bindingssløyfer for interaksjon med et mål, større enn det til et molekyl med en enkel peptidsløyfe med et mål. Den større bindingsoverflaten kan tilveiebringe forbedret bindingsaffinitet og/eller kan også tilveiebringe forbedret spesifisitet.

10

I et aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes dermed et kompleks som omfatter en fagpartikkel, der nevnte fagpartikkel omfatter

(i) et polypeptid:

(ii) en nukleinsyre som koder for polypeptidet i (i) og som er fremvist på overflaten av fagen;

15

(iii) en koblingsforbindelse festet til nevnte polypeptid

hvor nevnte koblingsforbindelse er festet til polypeptidet med minst tre adskilte kovalente bindinger.

20

Det er hensiktsmessig at de kovalente bindingene er adskilte kovalente bindinger i betydningen av at hver er en separat binding mellom koblingsforbindelsen og en del av polypeptidet. For eksempel ville en enkel bro mellom polypeptidet og koblingsforbindelsen hvis enkle bro utgjør tre kovalente bindinger (f. eks. koblingsforbindelse - x - y - polypeptid hvor "-" representerer en kovalent binding), ikke betraktes som å omfatte minst tre adskilte kovalente bindinger fordi de tre bindingene ikke er tre separate broer eller koblinger fra koblingsforbindelsen til målpeptidet. Det underliggende prinsippet er at koblingsforbindelsen/molekylstammen og polypeptidet kobles med minst tre separate kovalente brodannende bindinger.

25

30

Det er hensiktsmessig at hver av de minst tre kovalente bindingene blir dannet med en separat aminosyrerest i polypeptidet. Med andre ord er det hensiktsmessig at en separat aminosyrerest er en individuell eller distinkt aminosyrerest – mer enn en binding kan dannes med en enkel art eller type aminosyrerest, f.eks. kan to av bindingene hver dannes med cysteinrester, men det er hensiktsmessig at de to cysteinrestene er separate cysteinrester.

35

Koblingsforbindelsen-polypeptiddelen av komplekset beskrevet ovenfor blir noen ganger referert til som "konjugatet". I noen utførelsesformer kan konjugatet (dvs. en polypeptid-koblingsforbindelsesenheter som korresponderer til den som er omfattet av komplekset ifølge oppfinnelsen) syntetiseres separat. I denne utførelsesformen trenger konjugatet ikke være i kompleks med en nukleinsyre. Dette er diskutert i mer detalj under.

Det er hensiktsmessig at "koder for" har sin naturlige betydning i fagfeltet, dvs. koder for i betydningen av den universelle triplettkoden for å omdanne nukleinsyresekvens til polypeptidsekvens. I fagfeltet kan "kode for" ha blitt anvendt i betydningen av "tagging" eller "oppvikling", f.eks. når en unik nukleotidsekvens anvendes for å tagge en del og at kjennskap til nukleotidsekvensen kan "avkode", dvs. fortelle brukeren hvilken tagget del som var til stede, men likevel uten å ha noe biologisk slektskap til denne strukturen. I foreliggende oppfinnelse blir "kode for" og "avkode" imidlertid anvendt på den tradisjonelle måten for å referere til koding i betydningen translasjon fra nukleinsyresekvens til aminosyresekvens.

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter et organisk molekyl. Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter et lite organisk molekyl.

Det er hensiktsmessig at de kovalente bindingene dannes mellom koblingsforbindelsen og aminosyrerestene i polypeptidet.

Det er hensiktsmessig at nevnte polypeptid omfatter en cysteinrest og det er hensiktsmessig at minst en av nevnte tre adskilte kovalente bindinger for festing av nevnte koblingsforbindelse til polypeptidet, omfatter en binding til nevnte cysteinrest.

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen har molekylsymmetri som korresponderer med antall kovalente bindinger som den er festet med til polypeptidet.

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen innehar tredobbel molekylstruktur og at koblingsforbindelsen er festet til polypeptidet med tre kovalente bindinger.

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter en strukturell rigid kjemisk gruppe.

5 Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter tris-(brommetyl)benzen (TBMB).

10 Nukleinsyrer har deres vanlige betydning i fagfeltet og kan omfatte DNA, RNA eller en hvilken som helst annen nukleinsyre. Nukleinsyre kan omfatte oligonukleotid(er) eller faggenom(er) eller et hvilket som helst annet egnet eksempel på nukleinsyrer som er kjent av en fagperson.

Nevnte nukleinsyre omfattes av nevnte fagpartikkel.

15 I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse et genetisk kodet polypeptidbibliotek som omfatter minst to forskjellige komplekser som beskrevet over.

20 I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å lage et kompleks, der nevnte fremgangsmåte omfatter

(i) å tilveiebringe en fagpartikkel som omfatter en nukleinsyre og et polypeptid uttrykt av nukleinsyren og fremvist på fagpartikkelen

(ii) å tilveiebringe en koblingsforbindelse

25 (iii) å tilføye nevnte koblingsforbindelse til nevnte polypeptid ved dannelse av minst tre kovalente bindinger mellom nevnte koblingsforbindelse og polypeptidet.

30 Det er hensiktsmessig at de reaktive gruppene til polypeptidet som fremvises på fagpartikkelen, er redusert og det er egnet at fagpartiklene som fremviser polypeptidet som omfatter reduserte reaktive grupper, renses ved filtrering før trinn (iii). Det er hensiktsmessig at når de reaktive gruppene omfatter cystein, er de reduserte; i denne utførelsesformen er rensingen rensing fra reduksjonsmiddel, for eksempel ved filtrering.

35 Det er hensiktsmessig at etter filtreringsrensetrinnet opprettholdes polypeptidet i

den reduserte tilstanden for binding til koblingsforbindelsen ved inkubering i avgasset buffer og i nærværet av chelateringsmiddel.

5 Det er hensiktsmessig at trinn (iii) omfatter inkubering av polypeptidet og koblingsforbindelsen sammen ved 30 °C ved pH 8 i vandig buffer som omfatter acetonitril.

10 Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter tris-(brommetyl)benzen (TBMB).

Det er hensiktsmessig at tris-(brommetyl)benzen er til stede ved 10 µm.

15 Det er hensiktsmessig at tri-(brommetyl)benzen er til stede ved 10µm, chelateringsmidlet er etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), acetonitrilet er til stede ved 20 % og inkuberingstrinn (iii) utføres i 1 time.

20 Det er hensiktsmessig at nevnte fremgangsmåte omfatter det ytterligere trinnet (iv) som kløyver en eller flere bindinger til polypeptidkjeden. Dette har den fordel at det modifierer polypeptidkjeden. For eksempel kan dette ha fordel med å produsere flere polypeptider festet til en enkel koblingsforbindelse, f.eks. når kløyvningen finner sted på polypeptidkjeden mellom bindinger mellom polypeptidet og koblingsforbindelsen. Det er hensiktsmessig at nevnte kløyvningstrinn omfatter at nevnte polypeptid kommer i kontakt med en protease.

25

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse et kompleks fremskaffet ved en fremgangsmåte som beskrevet over.

30 I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å identifisere et kompleks ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene som er i stand til å binde en ligand, der fremgangsmåten omfatter

- (i) å tilveiebringe et kompleks som beskrevet over
- (ii) å la nevnte kompleks komme i kontakt med en ligand og
- (iii) å selektene de kompleksene som binder nevnte ligand.

35

Slik seleksjonsfremgangsmåte kan utføres i et hvilket som helst format. Det er hensiktsmessig at liganden er immobilisert. Komplekset settes så i kontakt med den immobiliserte liganden. Ikke-bindende kompleks(er) blir så vasket bort. På denne måten blir de kompleksene som binder den immobiliserte liganden, anrikt eller selektert. I en utførelsesform er det mulig at kompleksene kan gjenvinnes ved frigjøring av liganden, dvs. frigjøring eller eluering av kompleksligand delen. Imidlertid er det egnet at kompleksene gjenvinnes ved eluering (separering) fra den immobiliserte liganden. I denne utførelsesformen er de eluerte kompleksene ikke lenger bundet til liganden ved elueringstrinnet.

5

10

Kompleksene eller polypeptidet(/polypeptidene) i nevnte kompleks eller polypeptid-koblingsforbindelseskonjugatene av nevnte kompleks, kan være anvendbare i andre sammenhenger. For eksempel kan de være anvendbare som en basis for utformingen av medikamenter slik som små medikamenter eller de kan være anvendbare som CDR-er eller som bindingsdeler (f.eks. for tagging eller deteksjon av deres bindingspartner(e)) eller andre anvendelser hvor den nøye kunnskapen om interaksjonen kan utnyttes.

15

20

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet over som ytterligere omfatter å bestemme sekvensen til nukleinsyren til nevnte kompleks.

25

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet over som ytterligere omfatter trinnet med å produsere en mengde av det isolerte komplekset som er i stand til å binde til nevnte ligand.

30

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet over som ytterligere omfatter trinnet med å produsere en mengde av polypeptid-koblingsforbindelsesenheter som omfattes av et isolert kompleks som er i stand til å binde til nevnte ligand. I denne utførelsesformen kan polypeptid-koblingsforbindelsesenheter fordelaktig syntetiseres i fraværet av nukleinsyre.

35

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet over som ytterligere omfatter trinnet med å produsere en mengde av et polypeptid isolert eller identifisert ved hjelp av en fremgangsmåte ifølge

foreliggende oppfinnelse hvor nevnte polypeptid uttrykkes rekombinant eller blir kjemisk syntetisert. I en annen utførelsesform vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet over som ytterligere omfatter trinnet med å produsere en mengde av et polypeptid isolert eller identifisert ved hjelp av en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, der nevnte fremgangsmåte omfatter å feste en koblingsforbindelse til polypeptidet hvor koblingsforbindelsen kan være forskjellig fra koblingsforbindelsen tilført under isoleringen eller identifiseringen av polypeptidet, forutsatt at nevnte koblingsforbindelse er festet til nevnte polypeptid med minst tre kovalente bindinger og hvor nevnte polypeptid uttrykkes rekombinant eller blir kjemisk syntetisert.

#### **DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN**

Foreliggende oppfinnelse gir nye egenskaper og ledsagende fordeler som kan forklares i mer detalj i sammenheng med genereringen av genetisk kodete molekyler med en kjernestruktur. Nærmere bestemt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse begrensning med hensyn til konformasjonsbegrensning som ikke oppnås ved kjente peptidringlutningsteknikker. Videre har ikke kryssbinderen i kjente systemer slik som de til Roberts (*ibid*), karakteren til en sentral kjerne/koblingsforbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse. I de kjente systemene ble kryssbinderen anvendt kun for å erstatte en disulfidbinding for å danne et redoks-insensitivt syklisk peptid. Det nevnes ikke noe om eller foreslås noe i forhold til konseptet med en sentral kjerne med flere festinger slik som et trippel kovalent bundet koblingsforbindelsespolypeptidkompleks som forklares her. Det må faktisk sies at i den foreliggende oppfinnelsen er polypeptidet koblet til kjernestrukturen via minst tre kovalente bindinger og tilveiebringer en sentral strukturell forskjell sammenlignet med kjente systemer. Koblingen av en kjernestruktur (koblingsforbindelse) til et genetisk kodet polypeptid via tre eller flere bindinger er en kompleks reaksjon som tidligere ikke er vist.

Koblingen av et polypeptid til en koblingsforbindelse via minst tre kovalente bindinger kan ytterligere gi flere forskjellige produkter. Dette kan forårsake vanskeligheter i seleksjonsprosessen og i avkodingsprosedyren. Ifølge foreliggende oppfinnelse blir det imidlertid tilveiebrakt en løsning ved å anvende en koblingsforbindelse med tre reaktive grupper og fortrinnsvis tredoblet

rotasjonssymmetri hvor kombinasjonen har den fordel at den gir et enkelt produkt. Selvsagt vil en leser med fagkunnskap forstå at under visse uklare omstendigheter kan en koblingsforbindelse med en tredobbel rotasjonssymmetri gi flere produkter, særlig i eksemplet med et tetrahedralt molekyl med tre identiske reaktive grupper; dette har også en tredobbel rotasjonssymmetri, men det ville gi to stereoisomerer. Ikke desto mindre, for å lette forståelsen av at slike teoretiske unntak for dannelsen av et enkelt produkt kan forstås som å være mulig, gir egnede koblingsforbindelser med en tredobbel rotasjonssymmetri et enkelt produkt ifølge foreliggende oppfinnelse; i de sjeldne omstendighetene som er nevnt ovenfor, blir det egnede polypeptidet valgt for å unngå dannelsen av tetrahedrale molekyler og opprettholder derfor dannelsen av kun et produkt.

Koblingsforbindelsen anvendt i fremgangsmåtene og sammensetningene som er beskrevet her, er forskjellige fra kjente toverdige kryssbindere (f.eks. som anvendt av Millward *et al. ibid.*) i det sentrale kravet at en koblingsforbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse har minst tre reaktive grupper som kan danne minst tre kovalente bindinger med målpolypeptidet. Denne egenskap gir flere tekniske fordeler til oppfinnelsen. For det første, ved å binde koblingsforbindelsen til polypeptidet via minst tre kovalente bindinger blir minst to polypeptidsløyfer dannet. Disse sløyfene dannes mellom den første og den andre bindingen og mellom den andre og den tredje bindingen til koblingsforbindelsen til polypeptidet. Den kjente linkerens beskrevet av Millward *et al.*, kan kun forbinde to funksjonelle grupper til et peptid og kan ikke danne to eller flere begrensede peptidsløyfer.

### **Fordeler med koblingsforbindelse-polypeptidbinding**

Det er en rekke egenskaper som skiller molekyler ifølge oppfinnelsen som har 3 eller flere koblinger til en koblingsforbindelse, fra andre molekyler slik som de med kun 2 koblinger. Noen av disse blir forklart herunder.

For det første vil det forstås at molekyler med to koblinger til en koblingsforbindelse er begrenset gjennom å koble de fleksible endene til et lineært peptid sammen. Dette er også tilfelle for molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse med 3 eller flere kovalente bindinger til en koblingsforbindelse.

Konformasjonen av molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse med 3 eller flere kovalente bindinger til en koblingsforbindelse er imidlertid begrenset av to tilleggseffekter som et molekyl med kun to koblinger har:

- 5 (i) polypeptidet som er bundet til koblingsforbindelsen via minst tre kovalente bindinger, vil omfatte minst to begrensende polypeptidsløyfer
- (ii) polypeptidsløyfene kan interagere med hverandre gjennom ikke-kovalente interaksjoner og generere tilleggsbegrensning
- 10 (iii) hver av sløyfene opptar rom som ikke kan opptas av de(n) andre sløyfen(e), noe som i tillegg begrenser deres konformasjonelle fleksibilitet.

For å illustrere disse punktene kan man forestille seg de mulige veiene som kan tas av et polypeptid festet ved punktene A og C til en koblingsforbindelse. 15 Introduksjonen av et festningspunkt B, mellom punktene A og C og til samme koblingsforbindelse, vil videre begrense de mulige veiene som polypeptidet kan ta og dermed dets konformasjonsentropi. Ettersom binding av peptidet til en ligand krever tap av konformasjonsentropi (og forutsatt at peptidet kan innta en konformasjon som er komplementær til en ligand) blir bindingsaffiniteten mellom 20 peptidet ABC begrenset ved mellompunktet B og liganden forventes å være høyere enn peptidet AC. Dermed kan høyere bindingsaffiniteter oppnås ved å anvende de begrensede molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse enn det som har vært mulig med kjent teknikk.

25 I tillegg til disse hovedpunktene blir ytterligere fordeler med de tre eller flere kovalente koblingene mellom polypeptid og koblingsforbindelse, beskrevet under.

30 Molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse kan binde seg til et mål gjennom interaksjonen av to eller flere konformasjonsbegrensede peptidsløyfer. Jo flere bindingsløyfer, jo høyere affiniteter og spesifisiteter kan oppnås. En parallell effekt skjer med antistoffer. De binder best når flere CDR-er interagerer med målet. Molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer dermed på en gunstig måte denne tekniske fordelene med flere sløyfer for interaksjon, denne 35 fordel er fraværende hos molekyler med færre enn tre bindinger.

I tillegg til den faktiske bestemmelsen om en andre (eller påfølgende) peptidsløyfe er det viktig å merke seg at en slik sløyfe også gir fordelene av konformasjonelt å begrense den andre sløyfen(e). Dette kan være gjennom å oppta noe av det begrensede tredimensjonale rommet som så ikke kan opptas av den andre sløyfen(e). Alternativt kan dette være gjennom ikke-kovalente interaksjoner mellom de mange sløyfene.

Fra disse fordelene kan det også legges merke til at flere strukturelle ligander binder generelt med høyere affiniteter (mindre entropi mistes ved binding) og spesifisiteter.

Som diskutert her tilveiebringer foreliggende oppfinnelse også produksjonen av sløyfepeptidstrukturer hvor hver av de to (eller flere) sløyfene har forskjellige egenskaper. Slike strukturer refereres til som "doble spesifikke" for å gjenspeile det faktum at en enkel molekylenheter har dobbel spesifisitet tilskrevet to forskjellige deler (sløyfer) i den samme generelle strukturen. Fordelen med slike utførelsesformer er at hver sløyfe kan velges eller konstrueres til å binde seg til et forskjellig mål (slik som et "antigen"). Dette representerer en ytterligere distinkt egenskap til et trebindingssystem ifølge foreliggende oppfinnelse.

I tillegg til disse effektene tilveiebringer molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse også muligheten for å lage en sandwich av et enkelt antigen (eller annen del) mellom to segmenter av polypeptidkjede. Selvsagt kan det bestemte arrangementet som brukes, være avhengig av geometrien til den bestemte konstruksjonen som blir anvendt, men i motsetning til kjente teknikker gir oppfinnelsen denne muligheten.

Selvsagt har diskusjonen ovenfor nevnt sløyfene som dannes ifølge foreliggende oppfinnelse. I noen utførelsesformer blir så disse sløyfene kløyvd. Det er viktig å legge merke til at selv i slike utførelsesformer dannes sløyfene, det er ganske enkelt at sløyfemolekylet blir behandlet som et intermediat som så ytterligere prosesseres ved kløyving av sløyfene for å produsere en bundet-flerlineær-peptidstruktur. I disse utførelsesformer, fordi peptidet til å begynne med er koblet til koblingsforbindelsen via tre eller flere kovalente bindinger, vil molekylene etter peptidkløyvning bli dekorert med tre eller flere peptiddeler.

Slike molekyler kan danne flere interaksjoner med mål og høyere bindingsaffiniteter/-spesifisiteter forventes, noe som er en ytterligere fordel med trebindingssystemet ifølge foreliggende oppfinnelse.

5 Det er en fordel at molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse som har to eller flere polypeptidsløyfer, kan danne flere interaksjoner med en målligand og kan derfor ha høyere affiniteter og/eller spesifisiteter enn polypeptidmolekyler med kun en enkel sløyfe. For eksempel kan det være ønskelig å foredle den andre sløyfen for bedre affinitet, noe som helt klart ikke er mulig for molekyler med en  
10 sløyfe.

Det er en fordel at i kompleksene ifølge foreliggende oppfinnelse holder koblingsforbindelsen minst to polypeptidsløyfer i tett romlig nærhet. Disse to eller flere sløyfer kan interagere samtidig med forskjellige epitoper på den  
15 samme målliganden.

Videre kan fordelene med å ha to eller flere sløyfer utnyttes i produksjonen av "dobbel spesifikke" molekyler hvor en sløyfe har eller er valgt for en bestemt egenskap eller bindingsaffinitet og den andre sløyfen for en forskjellig egenskap eller affinitet. Disse molekyler refereres til som "bispesifikke" eller "dobbel spesifikke". Det er flere mulige typer. For eksempel,  
20

- (a) bispesifikke laget ved å selektere på sløyfe 1 og deretter på sløyfe 2 (eller flere)
- 25 (b) to koblede bisykliske makroringer
- (c) en bisyklisk makroring pluss peptid eller medikament.

For (a) kan dette vanligvis gjøres ved å lage/selektere en alikvot av et bibliotek mot et første antigen og en annen alikvot mot et andre antigen. De valgte sløyfene kan så kombineres parvis for eksempel ved hjelp av standard teknikker slik som å rekombinere nukleinsyresegmentene som koder for de to sløyfene, for å tilveiebringe et nytt bibliotek av forskjellige kombinasjoner av første og andre sløyfe. De parvis kombinerte molekylerne (f.eks. fag) kan så screenes og/eller selekteres for å binde mot begge antigenene sekvensielt. På denne måten kan  
30 bispesifikke som er i stand til å binde to separate antigenene, lages. Naturligvis kan denne fremgangsmåten utvides med ytterligere valgfrie trinn slik som at  
35

bindingsaffiniteter for hvert antigen kan forbedres ved mutasjon av hver sløyfe, hvor mutasjonen kan være dirigert eller til og med tilfeldig.

5 I en variasjon av denne teknikken kunne en alikvot av bibliotek selekteres for binding til et første antigen. Sløyfen som er viktigst for binding, kunne identifiseres, for eksempel med inspeksjon av "konsensussekvensen" blant de som er selektert som bindere, og den andre sløyfen kunne randomiseres og selekteres mot det andre antigenet.

10 De mest egnede bispesifikke av denne typen slik som beskrevet i (a) ville blitt fremstilt på fag.

15 Variantmolekyler bemerket i (b) og (c) ovenfor kan tilsvarende fremstilles som fag (på en lignende måte som ovenfor). Alternativt kan mest sannsynlig de to koblede enhetene selekteres separat og deretter fuseres på trinnet for kjemisk syntese, noe som kunne forenkle deres seleksjon/konstruksjon.

20 Det er en ytterligere signifikant gunstig egenskap av aspekter ifølge oppfinnelsen at i tillegg til koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse som tjener til å forbinde polypeptidsegmenter gjennom kovalente bindinger via aminosyrerester ved basen i hver peptidsløyfe, er også koblingsforbindelsen involvert i ytterligere ikke-kovalente interaksjoner (slik som ionebindinger, hydrofobe interaksjoner, hydrogenbindinger, Van der Waals-interaksjoner) med tilleggselementer av polypeptidkjeden slik som andre aminosyrerester, i motsetning til dette er den toverdige til Millward *et al.* lineær og veldig fleksibel (propyl) og dens eneste rolle er å forbinde to ender av et polypeptid for å danne et redoks-insensitivt sykklisk peptid. Det ville ikke forventes at linkerens til Millward *et al.* vil lage signifikante ikke-kovalente interaksjoner med polypeptidsløyfen ettersom den er liten og veldig fleksibel og det finnes faktisk ikke bevis for at den gjør det. Denne fordel av foreliggende oppfinnelse blir ytterligere illustrert i eksempeldelen sammen med bevis for de gunstige ikke-kovalente interaksjonene. Det er dermed hensiktsmessig at polypeptidet blir forbundet med koblingsforbindelsen via en eller flere ikke-kovalente interaksjoner i tillegg til den kovalente bindingen(e) som diskuteres her. Dette har den ytterligere fordel at det tilveiebringes tilleggsnivå av strukturell begrensning til komplekset/konjugatet ifølge oppfinnelsen.

25

30

35

5 Det er en fordel med foreliggende oppfinnelse at et molekyl med flere peptidsløyfer generelt er mer strukturert enn et polypeptid med en enkel peptidsløyfe. Veldig strukturerte molekyler har en tendens til å være mer spesifikke. I tillegg har godt strukturerte molekyler generelt bedre bindingsaffiniteter. Videre kan et molekyl med flere peptidsløyfer danne flere interaksjoner med en målligand enn et polypeptid med en enkel peptidsløyfe.

10 Det er en ytterligere fordel av aspekter ifølge foreliggende oppfinnelse at koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse også innehar konformasjonsbegrensninger avledet fra dens egen kjemiske struktur. For eksempel er noen kjemiske grupper kjent for å være lite fleksible, for å hindre rotasjon, for å tilveiebringe sterisk hindring eller begrensning, for å presentere en rigid struktur eller på annen måte tilveiebringe skaffold eller begrensning til

15 komplekset. Dermed er det hensiktsmessig at koblingsforbindelsen i oppfinnelsen omfatter en skaffoldgruppe slik som en rigid skaffoldgruppe. Funksjonen til denne skaffoldgruppen er å tilveiebringe molekylstruktur eller begrensning til komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse. I sammenheng med en foretrukket koblingsforbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, tris-

20 (brommetyl)benzen (TBMB), kan denne egenskapen illustreres med referanse til planarstrukturen til benzengruppen i TBMB. Denne benzengruppen er rigid på grunn av dens planarkarakter og er dermed i stand til å tjene som en skaffoldgruppe til koblingsforbindelsen, nærmere bestemt en rigid skaffoldgruppe.

25 I en mest foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse tilveiebringer dermed koblingsforbindelsen konformasjonsbegrensninger som følge av de minst tre kovalente bindingene til polypeptidet, tilveiebringer ytterligere struktur via de ikke-kovalente bindingene mellom koblingsforbindelsen og polypeptidet, og

30 koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse gir også ytterligere konformasjonsbegrensninger ved innholdet i sin egen kjemiske struktur som tjener som et rigid skaffold. For eksempel planarstrukturen til benzengruppen når koblingsforbindelsen omfatter det samme slik som når koblingsforbindelsen er tris-(brommetyl)benzen (TBMB).

35

## **KOBLINGSFORBINDELSE**

Koblingsforbindelsen blir noen ganger referert til som "molekylkjernen". Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen innehar molekylsymmetri. Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen innehar tre reaktive grupper og innehar tredobbel symmetri. Dette har fordelen av kun å fremstille et enkelt reaksjonsprodukt. Hvis koblingsforbindelsen ikke er et symmetrisk molekyl, så kan flere reaksjonsprodukter fremstilles. Dette kan føre til komplikasjoner eller kreve at den ønskede isomeren er separert fra de andre reaksjonsproduktene. Ved å anvende en koblingsforbindelse som har den egnede symmetri, blir slike problemer på en fordelaktig måte forbedret.

10

Det er en fordel med foreliggende oppfinnelse at polypeptidene som fremstilles, har en større kompleksitet enn kjente sykliske peptider. For eksempel kan polypeptider fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse inneha mer enn to sløyfer for interaksjon med andre kjemiske enheter. I tillegg har polypeptider fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse et større begrensingsnivå enn polypeptider som er kjent i fagfeltet. Disse to effektene danner sammen en ytterligere fordel ved at flere sløyfer (eller "sykluser") til polypeptidet bevares i tett fysisk nærhet til hverandre via deres bindinger til den felles koblingsforbindelsen. Dette tilveiebringer et ytterligere begrensingsnivå for konformasjonen til disse polypeptidene.

20

Vanligvis forbindes sykliske peptider i kjent teknikk ved å anvende flere cysteinrester slik som to cysteinrester, for å danne en bro mellom to deler av peptidet og dermed danne et syklisk polypeptid. Imidlertid er slike molekyler redoks-sensitive. Fremgangsmåten til Millward *et al* er direkte fokusert på fremstillingen av sykliske peptider som er redoks-insensitive. Med hensyn til dette avviker Millward *et al* sin fremgangsmåte fra kjent teknikk og lærer bort fra anvendelsen av cysteiner som reaktive grupper for modifikasjonen av polypeptider. I motsetning til dette er cysteiner, ifølge foreliggende oppfinnelse, foretrukne reaktive grupper.

25

30

Når det er tre eller flere reaktive grupper for minst tre adskilte kovalente bindinger til koblingsforbindelsen, trenger ikke nevnte reaktive grupper være cysteiner. For eksempel kan de reaktive gruppene omfatte en cystein og to ytterligere egnede reaktive grupper som for eksempel kan omfatte lysin, selenocystein eller andre. Mest egnet er alle tre reaktive grupper cysteiner.

35

Kjente teknikker har kun ført til fremstillingen av enkelsløyfepeptider. Ifølge foreliggende oppfinnelse kan minst to sløyfer eller til og med flere, fremstilles ved å binde polypeptidet ved forskjellige punkter til koblingsforbindelsen.

5

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse involverer som et minimum tre bindinger med polypeptidet. Dette har fordelen av større molekylbegrensning. Dette har ytterligere fordelen av presentasjonen av flere polypeptidsløyfer for interaksjon med andre deler.

10

I kjente teknikker er i beste fall et kryssbindingsmiddel blitt introdusert eller forbundet til polypeptidet slik som et genetisk kodet polypeptid. I motsetning til dette tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en koblingsforbindelse for den multiple koordineringen av forskjellige deler av det samme polypeptidet.

15

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er et lite molekyl. Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er et lite organisk molekyl.

20

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er eller kan være basert på naturlige monomerer slik som nukleosider, sukkerer eller steroider. Det er egnet at koblingsforbindelsen omfatter en kort polymer av slike enheter slik som en dimer eller en trimer.

25

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er en forbindelse med kjent toksisitet, det er hensiktsmessig at den har lav toksisitet. Eksempler på egnede forbindelser inkluderer kolesteroler, nukleotider, steroider eller eksisterende medikamenter slik som tamazapan.

30

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er et makromolekyl. Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er et makromolekyl sammensatt av aminosyrer, nukleotider eller karbohydrater.

35

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter reaktive grupper som er i stand til å reagere med funksjonelle grupper til målpeptidet for å danne kovalente bindinger.

Koblingsforbindelsen kan omfatte kjemiske grupper som aminer, tioler, alkoholer, ketoner, aldehyder, nitriler, karboksylsyrer, succinimider, maleimider, alkylhalider og acylhalider.

5

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen omfatter eller kan bestå av tris(brommetyl)benzen eller et derivat av den.

10

Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen har en tredobbel rotasjonssymmetri slik at reaksjonen mellom tre funksjonelle grupper i målpeptidet og koblingsforbindelsen danner en enkeltproduktisomer.

15

I noen utførelsesformer kan koblingsforbindelsen ha en tetrahedral geometri slik at reaksjonen mellom fire funksjonelle grupper i det kodete polypeptidet og koblingsforbindelsen ikke danner mer enn toprodukt isomerer.

En egnet koblingsforbindelse er 1,3,5-tris(brommetyl)benzen ('TBMB').

20

En egnet koblingsforbindelse er 2,4,6-tris(brommetyl)mesitylen. Den er lignende 1,3,5-tris(brommetyl)benzen, men inneholder i tillegg tre metylgrupper festet til benzenringen. Dette har den fordel at metylgruppene som er i tillegg, kan danne ytterligere kontakter med polypeptidet og følgelig tillegge mer strukturell begrensning.

25

Koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse er valgt fra enten et lite molekyl eller en makromolekylstruktur. Den nevnte koblingsforbindelsen er sammensatt av organiske, uorganiske eller organiske og uorganiske komponenter.

30

I en foretrukket utførelsesform er koblingsforbindelsen et lite organisk molekyl som for eksempel et lineært alkan. Mer egnet er koblingsforbindelsen et forgrenet alkan, et syklisk alkan, et polysyklisk alkan, en aromat, et heterosyklisk alkan eller en heterosyklisk aromat som gir fordelene av å være mindre fleksibel (dvs. mer rigid).

35

I en annen utførelsesform er koblingsforbindelsen valgt fra en

makromolekylstruktur som for eksempel et polypeptid, et polynukleotid eller et polysakkarid.

5 Koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder kjemiske grupper som tillater at funksjonelle grupper i polypeptidet i det kodede biblioteket ifølge foreliggende oppfinnelse danner koblinger med koblingsforbindelsen. Nevnte kjemiske grupper er valgt fra en rekke funksjonaliteter inkludert aminer, tioler, alkoholer, ketoner, aldehyder, nitriler, karboksylsyrer, estere, alkaner, alkyner, anhydrider, succinimider, maleimider, azider, alkylhalider og acylhalider.

10

I en utførelsesform er koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse tris(brommetyl)benzen eller et derivat av den.

### **POLYPEPTID**

15

De funksjonelle gruppene til de kodede polypeptidene blir hensiktsmessig tilveiebrakt ved sidekjeder med naturlige eller ikke-naturlige aminosyrer. De funksjonelle gruppene til de kodede polypeptidene blir hensiktsmessig valgt fra tiolgrupper, aminogrupeer, karboksylgrupper, guanidingrupeer, fenolgrupper eller hydroksylgrupper. De funksjonelle gruppene til de kodede polypeptidene kan hensiktsmessig velges fra azid-, keto-karbonyl-, alkyn-, vinyl- eller arylhalidgrupper. De funksjonelle gruppene til de kodede polypeptidene for å koble til en koblingsforbindelse kan hensiktsmessig være den amino- eller karboksyterminale enden av polypeptidet.

20

25

I noen utførelsesformer er hver av de funksjonelle gruppene til polypeptidet for å koble til en koblingsforbindelse av den samme typen. For eksempel kan hver funksjonelle gruppe være en cysteinrest.

30

I noen utførelsesformer kan de funksjonelle gruppene for å koble til en koblingsforbindelse omfatte to eller flere forskjellige typer eller de kan omfatte tre eller flere forskjellige typer. For eksempel kan de funksjonelle gruppene omfatte to cysteinrester og et N-terminalt amin.

35

I noen utførelsesformer kan alternative aminosyrer slik som naturlige aminosyrer være hensiktsmessige for kjemisk modifiserte polypeptider slik som fagfremviste peptider ifølge foreliggende oppfinnelse.

Cystein er den mest egnede aminosyren fordi den har den fordel at dens reaktivitet er mest forskjellig fra alle andre aminosyrer. Reaktive grupper som kan anvendes på koblingsforbindelsen for å reagere med tiolgrupper på cysteinene, er alkylhalider (eller også kalt halogenalkaner eller haloalkaner). Eksempler er brommetylbenzen (den reaktive gruppen eksemplifisert ved TBMB) eller jodacetamid. Andre reaktive grupper som anvendes for å koble selektivt forbindelser til cysteiner i proteiner, er maleimider. Eksempler på maleimider som kan anvendes som koblingsforbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse, inkluderer: tris-(2-maleimidoetyl)amin, tris-(2-maleimidoetyl)benzen, tris-(maleimido)benzen. Selenocystein er også en naturlig aminosyre som har en lignende reaktivitet til cystein og kan anvendes til de samme reaksjonene. Hvor enn cystein nevnes er den dermed vanligvis akseptabel for å substituere selenocystein med mindre sammenhengens foreslår noe annet. Mest hensiktsmessig blir cystein anvendt.

Lysiner (og primært aminer i den N-terminale enden av polypeptider) er også egnet som funksjonelle grupper for å modifisere peptider på fag ved å koble til en koblingsforbindelse. Imidlertid er de mer forekommende i fagproteiner enn cysteiner og det er en høyere risiko for at fagpartiklene blir kryssbundet eller at de mister deres infektivitet. Ikke desto mindre fant vi at lysiner er spesielt anvendbare i intramolekylære reaksjoner (f.eks. når en koblingsforbindelse allerede er koblet til fagpeptidet) for å danne en andre eller etterfølgende kobling med koblingsforbindelsen. I dette tilfellet reagerer koblingsforbindelsen fortrinnsvis med lysiner i det fremviste peptidet (nærmere bestemt lysiner som er i tett nærhet). Funksjonelle grupper som reagerer selektivt med primære aminer, er succinimider, aldehyder eller alkylhalider. Med hensyn til alkylhalider vil leseren vite at alkylhalider med forskjellige reaktiviteter eksisterer. I brommetylgruppen som vi har anvendt i en rekke av de medfølgende eksemplene, kan elektroner i benzenringen stabilisere den kationiske transisjonstilstanden. Dette bestemte alkylhalidet er derfor 100-1000 ganger mer reaktivt enn alkylhalider som ikke er forbundet med en benzengruppe. Eksempler på succinimider for anvendelse som koblingsforbindelse inkluderer tris-(succinimidylaminotriacetat), 1,3,5-benzotrieddiksyre. Eksempler på aldehyder for anvendelse som koblingsforbindelse inkluderer triformylmetan. Eksempler på alkylhalider for anvendelse som koblingsforbindelse inkluderer

1,3,5-tris(brommetyl)-2,4,6-trimetylbenzen, 1,3,5-tris(brommetyl)benzen,  
1,3,5-tris(brommetyl)-2,4,6-trimetylbenzen.

5 I noen utførelsesformer kan molekyllinkere eller modifikasjoner tilsettes til (eller for å danne) funksjonelle grupper i de kodete polypeptidene før festingen til koblingsforbindelsen hvor nevnte linkere eller modifikasjoner er i stand til å reagere med koblingsforbindelsen.

10 Aminosyrene med funksjonelle grupper for å koble til en koblingsforbindelse kan være lokalisert ved en hvilken som helst egnet posisjon innen det kodete polypeptidet. For å influere de bestemte strukturene eller sløyfene som dannes, kan posisjonene til aminosyrene som har de funksjonelle gruppene varieres av en erfaren fagperson, dvs. ved manipulering av nukleinsyren som koder for polypeptidet med den hensikt å mutere polypeptidet som blir fremstilt.

15 Hver av aminosyrene i det kodete polypeptidet kan være et mål for mutagenese (f.eks. begrenset forandringsmutagenese) ifølge behovene til fagpersonene eller formålet som oppfinnelsen skal anvendes til. Det er klart at minst tre funksjonelle grupper for å binde til koblingsforbindelsen er nødvendig på polypeptidet av interesse. Andre aminosyrer enn de som er nødvendige for å binde til koblingsforbindelsen, kan fritt varieres i henhold til operatørbehov, og kalles "variable aminosyrer". Nevnte variable aminosyrer i det kodete polypeptidet (f.eks. polypeptidbibliotekmedlemmer) kan randomiseres, delvis randomiseres eller være konstant.

25 Målpolypeptidet omfatter en bindingsdel for koblingsforbindelse. Dette er regionen som koblingsforbindelsen festes til. Det er hensiktsmessig at tolkningen med hensyn til funksjonelle grupper anvendes for denne bindingsdelen. Det er hensiktsmessig at bindingsdelen for koblingsforbindelsen til målpolypeptidet omfatter 1 til 20 aminosyrerester. Det er hensiktsmessig at bindingsdelen for koblingsforbindelsen til målpolypeptidet omfatter færre enn 10 aminosyrer. Dette har den fordel at det pålegges ytterligere konformasjonsbegrensning på polypeptidsegmentet når det er festet til koblingsforbindelsen.

35 Målpolypeptidet omfatter hensiktsmessig sekvensen  $AC(X)_6C(X)_6CG$  hvor X står for en tilfeldig naturlig aminosyre, A for alanin, c for cystein og G for glysin.

Målpolypeptidet omfatter hensiktsmessig sekvensen (X)IY(X)<sup>m</sup>Y(X)<sup>n</sup>Y(X)<sup>o</sup> hvor Y representerer en aminosyre med en funksjonell gruppe, X representerer en tilfeldig aminosyre, m og n er tall mellom 1 og 20 som definerer lengden på mellomliggende polypeptidsegmenter og 1 og o er tall mellom 0 og 20 som definerer lengden av de flankerende polypeptidsegmentene.

I noen utførelsesformer kan komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte et polypeptid med sekvensen AC(X)<sub>6</sub>C(X)<sub>6</sub>CG. I en utførelsesform kan et bibliotekmedlem eller kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte en mesitylenkoblingsforbindelse og et polypeptid med sekvensen AC(X)<sub>6</sub>C(X)<sub>6</sub>CG hvor polypeptidet er festet til de eksosykliske metylgruppene i koblingsforbindelsen via cysteinrester i polypeptidet som danner tre tioeterbindinger dertil og hvor X står for en aminosyre (hensiktsmessig en naturlig aminosyre), A for alanin, C for cystein og G for glysin.

Det er hensiktsmessig at polypeptidet omfatter en inhibitor av humant plasmakallikrein og polypeptidet omfatter en eller flere av aminosyresekvensene GCSDRFRNCPADEALCG, ACSDRFRNCPLWSGTCG, ACSTERRYCPIEIFPCG, ACAPWRTACYEDLMWCG, ACGTGEGRCRVNWTPCG eller en relatert sekvens.

Med relatert sekvens menes en aminosyresekvens som har minst 50 % identitet, hensiktsmessig minst 60 % identitet, hensiktsmessig minst 70 % identitet, hensiktsmessig minst 80 % identitet, hensiktsmessig minst 90 % identitet, hensiktsmessig minst 95 % identitet, hensiktsmessig minst 98 % identitet, hensiktsmessig minst 99 % identitet. Identitet blir hensiktsmessig bedømt over en tilstøtende del på minst 10 aminosyrer, hensiktsmessig minst 12 aminosyrer, hensiktsmessig minst 14 aminosyrer, hensiktsmessig minst 16 aminosyrer, hensiktsmessig minst 17 aminosyrer eller full-lengden av referansesekvensen.

Det er hensiktsmessig at målpolypeptidet omfatter en inhibitor av human katepsin G og at polypeptidet omfatter en eller flere av aminosyresekvensene ACEYGDLWCGWDPVCG, ACIFDLGFCHNDWWNCG, ACLRAQEDCVYDRGFCG eller en relatert sekvens.

Det er hensiktsmessig at målpolypeptidet omfatter en inhibitor av human

urokinase-type plasminogenaktivator og at polypeptidet omfatter en eller flere av aminosyresekvensene ACNSRFSGCQIDLLMCG, ACSRYEVDRCRGRGSACG eller en relatert sekvens.

5 Det er hensiktsmessig at målpolypeptidet er omfattet av et bibliotek av polypeptider som inneholder minst  $10^5$  medlemmer. Foreliggende oppfinnelse vedrører også slike biblioteker.

### **REAKTIVE GRUPPER I POLYPEPTID**

10 Koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan bindes til polypeptidet via funksjonelle reaktive grupper på polypeptidet. Disse dannes vanligvis fra sidekjeder med bestemte aminosyrer funnet i polypeptidpolymeren. Slike reaktive grupper kan være en cystein sidekjede, en lysin sidekjede eller en N-terminal amingruppe eller en hvilken som helst annen egnet reaktiv gruppe.

15

Det er hensiktsmessig at minst en funksjonell gruppe er en cysteingruppe. Grupper slik som lysin eller de N-terminale aminene er vanligvis ikke reaktive nok til å binde til koblingsforbindelsen på egen hånd innenfor en passende tidsramme. Med en gang koblingsforbindelsen er festet eller bundet til minst et

20 cystein, betyr imidlertid ordinær reaksjonskinetikk at lysinet eller aminbindingene raskt og stabilt kan dannes deretter. På grunn av dette er det hensiktsmessig at minst en av de funksjonelle gruppene er en cysteingruppe.

25

Hvis andre reaktive grupper på polypeptidet enn cystein-/lysin-/amingrupper er ønskelig, så kan en annen koblingsforbindelse velges for å pare med de bestemte funksjonelle reaktive gruppene som er valgt på målpolypeptidet

30

Det er hensiktsmessig at cystein-, lysin eller amingrupper anvendes som de funksjonelle eller reaktive gruppene på polypeptidet av interesse.

35

Det er hensiktsmessig at minst tre kovalente bindinger dannes mellom koblingsforbindelsen og polypeptidet av interesse.

I noen utførelsesformer kan fire bindinger eller til og med flere dannes mellom koblingsforbindelsen og polypeptidet av interesse. Hvis mer enn fire bindinger anvendes, blir imidlertid vanligvis produktblandingen som dannes, økende

kompleks, og kan hindre de påfølgende anvendelsene og anvendelsesområdene. På grunn av dette er tre bindinger eller fire bindinger mellom koblingsforbindelsen og polypeptidet av interesse foretrukket. I en hvilken som helst utførelsesform er molekylsymmetri av koblingsforbindelsen foretrukket.

5 Mest foretrukket er koblingsforbindelser som har tre funksjonelle eller reaktive grupper. Mest foretrukket er koblingsforbindelser som har tredobbel molekylsymmetri.

De funksjonelle gruppene til genetisk kodete polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse er i stand til å danne kovalente bindinger med koblingsforbindelsen/molekylkjernen. Funksjonelle grupper er spesifikke grupper med atomer innen enten naturlige eller ikke-naturlige aminosyrer. Det er foretrukket at funksjonelle grupper med en adskilt kjemisk reaktivitet anvendes for å koble polypeptidet til koblingsforbindelsen for å danne komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse. Anvendelsen av nevnte adskilte funksjonelle grupper tillater binding av koblingsforbindelsen/molekylkjernen utelukkende til fastsatte funksjonelle grupper i polypeptidet, men ikke til andre kjemiske grupper i hverken mangfoldighetselementene til polypeptidet, nukleotidsyren eller andre komponenter i komplekset.

20 Egnede funksjonelle grupper av naturlige aminosyrer er tiolgruppene i cystein, aminogruppene i lysin, karboksylgruppen i aspartat eller glutamat, guanidingruppen i arginin, fenolgruppen i tyrosin eller hydroksylgruppen i serin. Ikke-naturlige aminosyrer kan tilveiebringe en rekke funksjonelle grupper som inkluderer azid, et keto-karbonyl, en alkyn, en vinyl eller en arylhalidgruppe.

25 Amino og karboksylgruppen i den terminale enden av polypeptidet kan også tjene som funksjonelle grupper for å danne kovalente bindinger til en koblingsforbindelse/molekylkjerner.

30 De kodete polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder hensiktsmessig minst tre funksjonelle grupper. Nevnte polypeptider kan også inneholde fire eller flere funksjonelle grupper. Jo flere funksjonelle grupper som anvendes jo flere mangfoldighetssegmenter kan bindes til koblingsforbindelsen/molekylkjernen. Koblingen av et overdrevet antall funksjonelle grupper til en koblingsforbindelse/molekylkjerner er imidlertid ikke anbefalt fordi det kan føre til et u håndterlig antall produktisomerer. Det er

35

hensiktsmessig at tre, fire eller fem kovalente bindinger til en koblingsforbindelse blir anvendt; mest hensiktsmessig er tre eller fire kovalente bindinger; mest hensiktsmessig tre kovalente bindinger.

5 I en foretrukket utførelsesform blir kodete polypeptider med tre funksjonelle grupper dannet. Reaksjonen mellom nevnte polypeptid og en koblingsforbindelse/molekylkjerne som har en tredobbel rotasjonssymmetri genererer en enkeltprodukt isomer. Genereringen av en enkeltproduktisomer er gunstig av flere grunner. Nukleinsyrene (noen ganger referert til som de "genetiske kodene") i forbindelsesbiblioteket koder for kun de primære sekvensene til polypeptidet, men ikke for den isomere tilstanden til molekylene som dannes ved reaksjon mellom det kodete proteinet og molekylkjernen. Hvis kun en produktisomer kan dannes, defineres tildelingen av nukleinsyren til produktisomeren klart. Hvis flere produktisomerer dannes, kan ikke nukleinsyren gi noe informasjon om naturen til produktisomeren som ble isolert i en screening eller seleksjonsprosess. Dannelsen av en enkel produktisomer er også fordelaktig hvis et spesifikt medlem av et bibliotek ifølge foreliggende oppfinnelse syntetiseres. I dette tilfellet gir den kjemiske reaksjonen mellom polypeptidet og koblingsforbindelsen en enkel produktisomer istedenfor en blanding av isomerer.

I en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse dannes kodete polypeptider med fire funksjonelle grupper. Reaksjon mellom nevnte polypeptider med en koblingsforbindelse/molekylkjerne som har en tetrahedral symmetri, genererer to produktisomerer. Selv om de to forskjellige produktisomerene kodes for av en og samme nukleinsyre ("genetisk kode") kan den isomere naturen til den isolerte isomeren bestemmes ved kjemisk å syntetisere begge isomerer, å separere de to isomerene og å teste begge isomerene for binding til en målligand.

30 I en utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelser er minst en av de funksjonelle gruppene i polypeptidene ortogonal til de gjenværende funksjonelle gruppene. Anvendelsen av ortogonale funksjonelle grupper tillater å dirigere nevnte ortogonale funksjonelle grupper til spesifikke steder på molekylkjernen. Koblingsstrategier som involverer ortogonale funksjonelle grupper kan anvendes for å begrense antallet produktisomerer som dannes. Med andre ord, ved å velge

5 distinkte funksjonelle grupper for en eller flere av de minst tre bindingene til de som er valgt for det gjenværende av de minst tre bindingene, kan en bestemt rekkefølge av binding eller dirigering av spesifikke funksjonelle grupper til polypeptidet til spesifikke posisjoner på koblingsforbindelsen oppnås på en nyttig måte.

10 I en annen utførelsesform reagerer de funksjonelle gruppene i det kodede polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse med molekyllinkerne, hvor nevnte linkere er i stand til å reagere med en koblingsforbindelse/molekylskaffold slik at linkerene vil intervenere mellom koblingsforbindelsen og polypeptidet i den endelige bundne tilstanden.

15 Egnede aminosyrer hos medlemmene til de genetisk kodede kombinasjonskjemiske bibliotekene kan erstattes med en hvilken som helst naturlig eller ikke-naturlig aminosyre. Ekskludert fra disse utbyttbare aminosyrene er de som innehar funksjonelle grupper for å kryssbinde polypeptidene til en molekylkjerne. En gruppe tilstøtende aminosyrer som kan varieres, er definert som et polypeptidsegment. Størrelsen på et enkelt polypeptidsegment er hensiktsmessig i området fra 1 til 20 aminosyrer.

20 Polypeptidene har enten tilfeldige sekvenser, konstante sekvenser eller sekvenser med tilfeldige eller konstante aminosyrer. Aminosyrene med funksjonelle grupper er enten lokalisert i definerte eller tilfeldige posisjoner innenfor det kodede polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse.

25 I en utførelsesform er polypeptidene som er bundet med to aminosyrer som innehar funksjonelle grupper for binding til en koblingsforbindelse/molekylkjerne, korte aminosyresekvenser på 10 eller færre aminosyrer. Reaksjon mellom nevnte kodede polypeptidsekvenser med en molekylkjerne danner bibliotekmedlemmer med høy konformasjonsbegrensning.

30 Konformasjonsbegrensede ligander er generelt mer spesifikke og har høyere bindingsaffiniteter. Konformasjonsbegrensningen kan også beskytte ligandene fra proteolytisk degradering for eksempel i kroppsvæsker.

35 I en utførelsesform har et kodet polypeptid med tre funksjonelle grupper sekvensen  $(X)_iY(X)_mY(X)_nY(X)_o$ , hvor Y representerer en aminosyre med en funksjonell gruppe, X representerer en tilfeldig aminosyre, m og n er tall mellom

1 og 20 som definerer lengden av mellomliggende polypeptidsegmenter og l og o er tall mellom 0 og 20 som definerer lengden på de flankerende polypeptidsegmentene.

- 5 I en foretrukket utførelsesform har et kodet polypeptidbibliotek ifølge foreliggende oppfinnelsen sekvensen  $AC(X)_6C(X)_6CG$  hvor A representerer alanin, C representerer cystein, X representerer en tilfeldig naturlig aminosyre og G representerer glysin.
- 10 Alternativer til tiolstyrte konjugeringer kan anvendes for å feste koblingsforbindelsen til peptidet via kovalente interaksjoner. Alternativt kan disse teknikkene anvendes i modifikasjon eller festing av ytterligere deler (slik som små molekyler av interesse som er adskilte fra koblingsforbindelsen) til polypeptidet etter at de er blitt selektert eller isolert ifølge foreliggende oppfinnelse – i denne utførelsesformen er det klart at festingen ikke trenger å
- 15 være kovalent og kan omfatte ikke-kovalent festing. Disse fremgangsmåtene kan anvendes istedenfor (eller i kombinasjon med) de tiolstyrte fremgangsmåtene ved å produsere fag som fremviser proteiner og peptider som bærer unaturlige aminosyrer med nødvendige kjemiske funksjonelle grupper, i
- 20 kombinasjon små molekyler som bærer den komplementære funksjonelle gruppen eller ved å inkorporere de unaturlige aminosyrene inn i et kjemisk eller rekombinant syntetisert polypeptid når molekylet fremstilles etter seleksjons-/isoleringsfasen.
- 25 De unaturlige aminosyrene som er inkorporert inn i peptidene og proteinene på fag, kan inkludere 1) en ketonfunksjonell gruppe (som funnet i para- eller metaacetyl-fenylalanin) som spesifikt kan reagere med hydraziner, hydroksylaminer og deres derivater (Addition of the keto functional group to the
- 30 genetic code of *Escherichia coli*. Wang L, Zhang Z, Brock A, Schultz PG. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 7;100(1):56-61; Bioorg Med Chem Lett. 2006 Okt 15;16(20):5356-9. Genetic introduction of a diketone-containing amino acid into proteins. Zeng H, Xie J. Schultz PG), 2) azider (som funnet i p-azid-fenylalanin) som kan reagere med alkyner via kopperkatalysert "klikk-kjemi" eller stammefremmet (3+2) for å danne de korresponderende triazolen (Addition of
- 35 p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. Chin JW, Santoro SW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2002 Aug

- 7;124(31):9026-7; Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. Deiters A, Cropp TA, Mukherji M, Chin JW, Anderson JC, Schultz PG. *J Am Chem Soc.* 2003 Oct 1;125(39):11782-3) eller azider som kan reagere med arylfosfiner via en Staudinger-ligering (Selective Staudinger modification of proteins containing p-azidophenylalanine. Tsao ML, Tian F, Schultz PG. *Chembiochem.* 2005 Dec;6(12):2147-9) for å danne de korresponderende amidene, 4) alkyner som kan reagere med azider for å danne det korresponderende triazolet (In vivo incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli*. Deiters A. Schultz PG. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005 Mar 1;15(5):1521-4), 5) borsyrer (borater) som spesifikt kan reagere med forbindelser som inneholder mer enn en egnet romlig hydroksylgruppe eller gjennomgå palladiumstyrt kobling med halogenerte forbindelser (*Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(43):8220-3. A genetically encoded boronate-containing amino acid., Brustad E, Bushey ML, Lee JW, Groff D, Liu W, Schultz PG), 6) metallchelaterende aminosyrer inkludert de som bærer bipyridyler som spesifikt kan koordinere et metallion (*Angew Chem Int Ed Engl.* 2007;46(48):9239-42. A genetically encoded bidentate, metal-binding amino acid. Xie J, Liu W, Schultz PG).
- 20 Unaturlige aminosyrer kan inkorporeres inn i proteiner og peptider fremvist på fag ved å omdanne *E. coli* med plasmider eller kombinasjoner av plasmider som bærer: 1) den ortogonale aminoacyl-tRNA-syntetasen og tRNA som dirigerer inkorporeringen av den unaturlige aminosyren som respons på et kodon, 2) fag-DNA-et eller fagemidplasmidet forandret til å inneholde det valgte kodonet ved
- 25 stedet for unaturlig aminosyreinkorporering (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 18;105(46):17688-93. Protein evolution with an expanded genetic code. Liu CC, Mack AV, Tsao ML, Mills JH, Lee HS, Choe H, Farzan M, Schultz PG, Smider W; A phage display system with unnatural amino acids. Tian F, Tsao ML, Schultz PG. *J Am Chem Soc.* 2004 Dec 15;126(49):15962-3). Den ortogonale aminoacyl-
- 30 tRNA-syntetasen og tRNA kan være avledet fra *Methanococcus janaschii* tyrosyl-paret eller en syntetase (Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11020-4) og tRNA-par som naturlig inkorporerer pyrrolysin (Multistep engineering of pyrrolysyl-tRNA
- 35 syntetase to genetically encode N(epsilon)-(o-azidobenzyloxykarbonyl) lysine for site-specific protein modification. Yanagisawa T, Ishii R, Fukunaga R,

Kobayashi T, Sakamoto K, Yokoyama S. *Chem Biol.* 2008 Nov 24;15(11):1187-97; Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. Neumann H, Peak-Chew SY, Chin JW. *Nat Chem Biol.* 2008 Apr;4(4):232-4. Epub 2008 Feb 17). Kodonet for å inkorporere kan være amberkodonet (UAG), et annet stopp-kodon (UGA eller UAA), alternativt kan det være et firebasekodon. Aminoacyl-tRNA-syntetase og tRNA kan fremstilles fra eksisterende vektorer, inkludert pBK-serien med vektorer pSUP (Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*. Ryu Y, Schultz PG. *Nat Methods.* 2006 Apr;3(4):263-5) vektorer og pDULE vektorer (Not Methods. 2005 May;2(5):377-84. Photo-cross-linking interacting proteins with a genetically encoded benzophenone. Farrell IS, Toroney R, Hazen JL, Mehl RA, Chin JW). *E. coli*-stammen som ble anvendt, vil uttrykke F'-filusen (generelt via et traoperon). Når amberundertrykkelse anvendes, vil *E. coli*-stammen i seg selv ikke inneholde et aktivt ambersuppressor tRNA-gen. Aminosyren tilsettes dyrkningsmediet, fortrinnsvis med en sluttkonsentrasjon på 1 mM eller høyere. Effektiviteten av aminosyreinkorporeringen kan forsterkes ved å anvende en uttrykkskonstruksjon med et ortogonalt ribosombindingssete og å transludere genet ribo-X (Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Wang K, Neumann H, Peak-Chew SY, Chin JW. *Not Biotechnol.* 2007 Jul;25(7):770-7). Dette kan tillate effektiv inkorporering på flere steder av den unaturlige aminosyren som tilveiebringer flere festesteder for liganden.

### RENSING AV FAG

En hvilken som helst egnet måte for å rense fagen kan anvendes. Standard teknikker kan benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel kan fagen renses ved filtrering eller ved rensing slik som PEG-presipitering; fagpartikler kan fremstilles og renses med polyetylen glykol (PEG)-presipitering som tidligere beskrevet.

I tilfelle det trengs mer veiledning refereres det til Jaspers et al (*Protein Engineering Design and Selection* 2004 17(10):709-713. Selection of optical biosensors from chemisynthetic antibody libraries). Egnede fag kan renses som anvist der. Teksten til denne publikasjonen er spesifikt inkorporert her ved referanse for fremgangsmåten for fagrensing; nærmere bestemt refereres det til

material og fremgangsmåtedelen som starter delvis nede i den høyre kolonnen på side 709 i Jespers *et al.*

5 Videre kan fagen renses som publisert av Marks *et al* J. Mol. Biol vol 222 s. 581-597, som er spesifikt inkorporert her ved referanse for den bestemte beskrivelsen av hvordan fagfremstillingen/rensingen utføres.

10 I tilfelle ytterligere veiledning er nødvendig kan fag reduseres og renses som følger. Om lag  $5 \times 10^{12}$  fagpartikler reagerer med 1 mM ditiotreititol (DTT) i 30 min ved romtemperatur, deretter blir de PEG-presipitert. Etter skylling med vann blir pelleten resuspendert i 1 ml reaksjonsbuffer (10 mM fosfat buffer, 1 mM EDTA, pH 7,8). Fagen reagerer så valgfritt med 50  $\mu$ l 1,6 mM N-[(2-jodacetoksy)etyl]-N-metyl-amino-7-nitrobenz-2-okso-1,3-diazol (NBDIA) (Molecular Probes) i 2 timer ved romtemperatur eller den reagerer mer  
15 hensiktsmessig med koblingsforbindelsen som beskrevet her. Reaksjonen termineres med PEG-presipitering av fagpartikler.

Ytterligere en måte fagen kan fremstilles/rensas på, omtales i Schreier og Cortese (A fast and simple method for sequencing DNA cloned in the single-stranded bacteriophage M13. Journal of molecular biology 129(1): 169-72, 20 1979). Denne publikasjonen vedrører kjedeterminerings-DNA-sekvenseringsfremgangsmåten til Sanger *et al.* (1977) som krever enkelttrådet DNA som templat. M13 fag-DNA eksisterer som enkelttråd og derfor kan hver DNA-sekvens som er klonet inn i M13, lett fremskaffes i denne formen. Schreier og Cortese viser at M13 enkelttrådet DNA rent nok til å anvendes som templat for sekvensbestemmelse, kan fremstilles ved enkel sentrifugering av fagpartikkelen og ekstraksjon med fenol. Schreier og Cortese-publikasjonen er spesifikt inkorporert her ved referanse for rensefremgangsmåten til fagen. For å unngå tvil blir ikke fenolekstraksjonen utført for å lage komplekser ifølge foreliggende oppfinnelse, fordi formålet med det er å rense nukleinsyrer. Dermed er det hensiktsmessig at fenoltrinnet til Schreier og Cortese kan utelates. Schreier og Cortese-fremgangsmåten følges kun til punktet med å rense fagpartiklene.

35 Dermed er det et utall teknikker som er velkjente i fagfeltet for å rense fag. I sammenhengen med foreliggende oppfinnelse blir slik rensing anvendt for å

fjerne reduksjonsmidlet som er anvendt for å redusere de funksjonelle gruppene i polypeptidene av interesse for binding til koblingsforbindelsen, spesielt når slik binding er via cysteinrester.

5 Valgfritt kan spesielt fordelaktige teknikker for å rense fag tas i bruk som diskutert i reaksjonskjemidelen nedenfor. Det bør uttrykkelig legges merke til at disse teknikker ikke betraktes som vesentlige for oppfinnelsen, men kan representere spesielt nyttige fremgangsmåter eller til og med den beste måten 10 for å lage fagpartikler på ifølge foreliggende oppfinnelse. Forutsatt at det tas hensyn til å unngå reksidering av de reduserte funksjonelle/reaktive gruppene på fagen ved trinnet for fjerning av reduksjonsmidlet før festing av koblingsforbindelsen, kan imidlertid i prinsippet en hvilken som helst teknikk anvendes for å oppnå dette. Filtringsteknikker beskrevet er spesielt effektive, men er også mer kompliserte enn standardteknikker slik at brukerne vil velge 15 teknikken som er best egnet for deres bestemte arbeid med oppfinnelsen. Det er mest hensiktsmessig at filtreringsteknikker brukes.

### **REAKSJONSKJEMI**

I tillegg til de konseptuelle innsiktene i sammenheng med den tredobbelt bundne 20 koblingsforbindelsen – polypeptidkonjugater og fagpartikler ifølge foreliggende oppfinnelse, har oppfinnerne også avledet et nøyaktig sett med kjemiske betingelser som kan tas i bruk for å oppnå den kjemiske koblingen mens integriteten til den genetisk kodede delen av produktet opprettholdes. Kjent teknikk i fagfeltet for modifisering av polypeptider har involvert tøff kjemi og 25 uavhengige polypeptidmodifikasjonsreaksjoner. I motsetning til dette tilveiebringer foreliggende oppfinnelse nye kjemiske betingelser for modifikasjonen av polypeptider mens funksjonen og integriteten til det genetisk kodede elementet av produktet bevares på en fordelaktig måte. Spesifikt, når det genetisk kodede elementet er et polypeptid fremvist på overflaten av en fag 30 som koder for det, er det fordelaktig at kjemien ikke kompromitterer den biologiske integriteten til fagen. Det blir beskrevet her at det er et smalt vindu av betingelser som disse kjemiske reaksjonene kan forsterkes med eller bli fasilitert med. Nærmere bestemt, noe som vil bli forklart i mer detalj under, er løsemidlene og temperaturene som anvendes viktige for en effektiv reaksjon. 35 Videre er også konsentrasjonen av reagensene som anvendes, medvirkende til å

fremme den korrekte bindingen mens de forbedrer eller eliminerer kryssbinding eller ødeleggelse av polypeptidene som blir modifisert.

5 Nærmere bestemt blir det omtalt at reduksjonen av cysteinene i målpolypeptidet er nødvendig for den mest effektive reaksjonen. Det er klart at reduksjonsmidlet anvendt for kjemisk å redusere de cysteinene må fjernes for å utføre den  
10 ønskede festingen. En kjent teknikk er å anvende ditiotreitol (DTT) for å redusere cysteinene og for fjerningen av reduksjonsmidlet for å presipitere partiklene slik som fagpartiklene i en presipiteringsreaksjon. Slike presipiteringsreaksjoner involverer vanligvis 20 % polyetylglykol (PEG) sammen med 2,5 molar NaCl som fører til presipitering av fagpartiklene. Oppfinnerne beskriver imidlertid at i noen eksperimenter førte ikke disse spesifikke standardbetingelsene til en effektiv reaksjon av cysteinestene i polypeptidet med koblingsforbindelsen, mest sannsynlig på grunn av  
15 redoksidering av en del av cysteinestene som var blitt redusert. Dette kunne ikke ha blitt forutsagt utifra en forståelse av kjent teknikk. Det bør legges merke til at denne standardteknikken fremdeles kan finne anvendelse i foreliggende oppfinnelse, nærmere bestemt når en fagarbeider er oppmerksom på behovet for å være årvåken ved bedømmelse/unngåelse av redoksidering. Oppfinnerne har imidlertid behandlet dette kryptiske problemet om hvordan fjerne  
20 reduksjonsmidlet mens cysteinene opprettholdes i deres reduserte tilstand. Som vil bli beskrevet i mer detalj herunder, finnes løsningene i strategiområder som inkluderer anvendelsen av triskarboksyetyl-fosfin, avgasset buffer, anvendelsen av chelatorer i reaksjonsblandingen og filtrering for å ekstrahere partiklene under gunstige kjemiske betingelser.

Reaksjonsbetingelser f.eks. for festing av koblingsforbindelsen til målpeptidet bør velges med omhu. Valg av betingelser kan variere avhengig av anvendelser som oppfinnelsen skal benyttes til. Særlig forsiktighet er nødvendig når  
30 målpolypeptidet omfattes av en fagpartikkel. Veiledning tilveiebringes gjennom spesifikasjonen og eksempeldelen.

Reaksjonsbetingelser som temperatur, konsentrasjon av koblingsforbindelse, løsemiddel og/eller pH bør velges slik at effektiv reaksjon av de funksjonelle  
35 gruppene til målpolypeptidet med koblingsforbindelsen tillates, men at nukleinsyren som koder for polypeptidet etterlates i en tilstand som tillater å

avkode (f.eks. sekvensen) og/eller formere de isolerte molekylene (f.eks. ved PCR eller ved fagpropagering eller en hvilken som helst annen egnet teknikk). Videre bør reaksjonsbetingelsene etterlate fagkappeproteinet i en tilstand som tillater at fagen formeres.

5

Tiolgrupper i et fagkodet polypeptid kan reduseres med et reduksjonsmiddel før festing til koblingsforbindelse. I en slik utførelsesform, nærmere bestemt i fagdisplay utførelsesformer eller nærmere bestemt når reduksjonsmidlet er TCEP, blir overskuddet av reduksjonsmiddel hensiktsmessig fjernet ved filtrering, f.eks. filtrering av fagen. Dette er spesielt fordelaktig fordi foreliggende oppfinnelse omtaler for første gang at konvensjonelle teknikker for fjerning av reduksjonsmidler slik som PEG/NaCl-presipitering noen ganger kan føre til suboptimal reaksjon med koblingsforbindelse, sannsynligvis på grunn av reoksidering av de reduserte funksjonelle sidegruppene til målpeptidet. Dermed er det en fordel med utførelsesformer hvor målpolypeptidet fremstilles ved reduksjon etterfulgt av rensing (fjerning av reduksjonsmiddel) via filtrering hvor overlegen konservering av de reduserte (og følgelig reaktive) funksjonelle gruppene i polypeptidet oppnås.

10

15

20

I foreliggende oppfinnelse blir reaksjonsbetingelser anvendt som på den ene siden tillater effektivt å koble det kodede polypeptidet til en koblingsforbindelse og på den andre siden etterlater den tilføyde nukleinsyren (og fagkappeproteiner) i en tilstand som tillater dens formering eller avkoding. Nevnte reaksjonsbetingelser er for eksempel reaksjonstemperaturen, konsentrasjon av koblingsforbindelse, løsemiddelsammensetning eller pH.

25

I en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse blir tiolgrupper i cysteinrester anvendt som funksjonelle grupper for å koble polypeptider til en molekylkjerne. For noen kjemiske reaksjoner er det nødvendig at tiolgruppene i polypeptidet reduseres. Tiolgrupper i fagfremviste polypeptider reduseres effektivt ved tilsetning av et reduksjonsmiddel som for eksempel tris(karboksyetyl)fosfin (TCEP). Fordi et overskudd av reduksjonsmiddel kan interferere med festingsreaksjonen blir det effektivt fjernet ved filtrering av fagen.

30

35

Reoksidering av tiolgruppene etter fjerning av TCEP blir hensiktsmessig forhindret ved avgassing av reaksjonsbufferen.

Reoksidering av tiolgruppene blir også hensiktsmessig forhindret ved kompleksdannelse av metallioner ved chelatering, for eksempel chelatering med etylendiamintetraeddiksyre (EDTA).

5

Mest hensiktsmessig blir reoksidering av tiolgruppene forhindret eller inhibert ved både chelatering og ved anvendelse av avgassingsbuffere.

10

I en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse oppnås festing av polypeptidet til koblingsforbindelsen ved å la de reaktive gruppene reagere i polypeptidet slik som tiolgrupper på et fagfremvist polypeptid med koblingsforbindelsen i en time. Det er hensiktsmessig at de reagerer ved 30 °C.

Det er hensiktsmessig at de reagerer med koblingsforbindelse (slik som tris(brommetyl)benzen) ved en konsentrasjon på 10 µM.

15

Det er hensiktsmessig at reaksjonen er i en vandig buffer.

Det er hensiktsmessig at reaksjonen skjer ved pH 8.

Det er hensiktsmessig at reaksjonsbufferen inneholder acetonitril.

Det er hensiktsmessig at reaksjonsbufferen inneholder 20 % acetonitril.

20

Det er mest hensiktsmessig at reaksjonen kjennetegnes ved to eller flere av de ovenfor nevnte betingelsene. Hensiktsmessig kjennetegnes reaksjonen av tre eller flere av de ovenfor nevnte betingelsene. Det er hensiktsmessig at reaksjonen kjennetegnes av fire eller flere av de ovenfor nevnte betingelsene.

25

Det er hensiktsmessig at reaksjonen kjennetegnes av fem eller flere av de ovenfor nevnte betingelsene. Det er hensiktsmessig at reaksjonen kjennetegnes av seks eller flere av de ovenfor nevnte betingelsene. Det er hensiktsmessig at reaksjonen kjennetegnes av hver av de ovenfor nevnte betingelsene.

30

Disse reaksjonsbetingelsene optimaliseres til kvantitativt å reagere med tiolgrupper i et polypeptid med de reaktive gruppene til tris(brommetyl)benzen. Under de samme reaksjonsbetingelsene forblir omlag 20 % av fagpartiklene infeksjøs for å bringe den genetiske koden inn i bakterieceller for formering og avkoding.

35

I en utførelsesform kan koblingsforbindelsen slik som TBMB, festes til målpolypeptidet, slik som et fagkodet polypeptid, ved reaksjon (inkubering)

mellom tiolgruppene i polypeptidet med TBMB (dvs. tris(brommetyl)benzen) ved en konsentrasjon på  $10 \mu\text{M}$  i vandig buffer pH 8 som inneholder 20 % acetonitril i en time ved  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

5 Oppfinnerne omtaler også effekten konsentrasjon av koblingsforbindelsen i reaksjonen har på faginfektivitet. Nærmere bestemt minimaliserer oppfinnelsen hensiktsmessig konsentrasjonen av koblingsforbindelsen anvendt i reaksjonen. Med andre ord, jo lavere konsentrasjonen av koblingsforbindelsen som anvendes på tidspunktet for reaksjonen med polypeptidet på fagen, er, jo bedre er det  
10 forutsatt alltid at tilstrekkelig koblingsforbindelse blir koblet til fagpolypeptidet. Fordelen med å minimalisere koblingsforbindelsen som er til stede på denne måten er overlegen konserveringen av faginfektiviteten etter kobling av koblingsforbindelsen. Når koblingsforbindelsen er TBMB, kan for eksempel konsentrasjoner av koblingsforbindelsen som er høyere enn  $100 \mu\text{M}$ ,  
15 kompromittere infektivitet. Når koblingsforbindelsen er TBMB, er det dermed hensiktsmessig at konsentrasjonen av TBMB som er til stede på tidspunktet for binding til polypeptidet er lavere enn  $100 \mu\text{M}$ . Det er mest hensiktsmessig at konsentrasjonen er som omtalt i eksempeldelen.

## 20 **MODIFIKASJON ETTER FESTING**

I noen utførelsesformer kan polypeptid-koblingsforbindelseskomplekset modifiseres på et tidspunkt etter festing.

I noen utførelsesformer blir polypeptidelementene ifølge foreliggende oppfinnelse  
25 proteolytisk kløyvd med en gang de er bundet til en koblingsforbindelse/molekylkjerne. Kløyvingen danner ligander som har adskilte peptidfragmenter bundet til en koblingsforbindelse/molekylkjerne.

For eksempel kan en eller flere aminbindinger i polypeptidet kløyves proteolytisk  
30 etter binding av polypeptidet til molekylkjernen. Dette har den fordel at det danner korte polypeptider som hver er koblet til koblingsforbindelsen med minst en kovalent binding, men som presenterer forskjellige molekylstrukturer som bevares i et kompleks som omfatter nukleinsyren som koder for opphavspolypeptidet. Polypeptidkløyvingen blir hensiktsmessig katalysert ved en  
35 hvilken som helst egnet måte kjent i fagfeltet slik som kontrollert hydrolyse eller flere egnede enzymatiske klyvninger ved en egnet protease. Proteasen kan være

en hvilken som helst egnet protease, men er foretrukket en protease med en spesifikk polypeptidgjenkjenningssekvens eller motiv. Dette fører på en fordelaktig måte til produksjon av flere definerte og/eller flere forutsigbare polypeptidkløvningsprodukter. I denne utførelsesform kan faktisk proteasegjenkjenningssekvensene bli systematisk tilsatt eller fjernet fra målpolypeptidet, for eksempel ved å manipulere nukleinsyren som koder for den. Dette tilveiebringer på en fordelaktig måte en større grad av kontroll og tillater at høyere forskjellighet blir produsert i molekylene fremvist ifølge foreliggende oppfinnelse. Mest hensiktsmessig omfatter polypeptidet minst et proteasegjenkjenningssete. Det er hensiktsmessig at nevnte kløvningssete omfattes innen aminosyresekvensen(e) mellom funksjonelle grupper på polypeptidet anvendt for kovalent binding til koblingsforbindelsen. Det er hensiktsmessig av hvert nevnte gjenkjenningssete omfattes innen aminosyresekvensen mellom funksjonelle grupper på polypeptidet anvendt for kovalent binding til koblingsforbindelsen.

Peptidsløvfene blir hensiktsmessig kløyd med en protease som gjenkjenner og prosesserer polypeptidet ved spesifikke aminosyreposisjoner slik som trypsin (arginin eller lysin i P1-posisjon) eller termolysin (alifatisk sidekjede i P1-posisjon). Enzymet anvendes ved en konsentrasjon som tillater effektiv prosessering av peptidsløvfene på det fremviste molekylet, men som skåner fagpartikkelen. De optimale betingelsene kan variere avhengig av lengden på polypeptidsløvfene og på proteasen som anvendes. Trypsin blir for eksempel anvendt ved 200 nM i TBS-Ca buffer (25 mM tris HCl/137 mM NaCl/1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) i 10 min ved 10 °C. En rekke proteaser som er egnet til å modifisere fremviste polypeptider, men som skåner fagen, er beskrevet i Kristensen, P. og Winter, G. (Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages *Fold Des.* 1998:3(5):321-8). Den enzymatiske prosesseringen av peptid på fag kan være en "delvis proteolyse" fordi det ikke kan ekskluderes at et begrenset antall fagkappeproteiner blir kløyd. Ved optimalisering av betingelsene blir dermed den beste balansen mellom maksimal kløyving av målet og den maksimale sparingen av fagpartiklene hensiktsmessig valgt.

Det er hensiktsmessig at målpolypeptidet omfatter minst et slikt proteolytisk kløvningssete. Det er hensiktsmessig at målpolypeptidet omfatter minst to slike

proteolytiske kløyvningsseter. Det er hensiktsmessig at målpolypeptidet omfatter minst tre slike proteolytiske kløyvningsseter.

5 I hver slik proteolyseutførelsesform er det hensiktsmessig at det første av slike proteaseseter er distalt for den første kovalente bindingen mellom målpolypeptidet og koblingsforbindelsen. Dette har den fordel at koblingsforbindelsen bevares på komplekset, fordi hvis målpolypeptidet kløyves før den første av slike bindinger, så vil polypeptid-koblingsforbindelseskomplekset bli separert fra nukleinsyren som koder for målpolypeptidet, noe som ikke er ønskelig for mesteparten av anvendelsen ifølge foreliggende oppfinnelse.

10 Anvendelsen av korte sløyfer (kort begynner ved f.eks. 6 aminosyrer eller færre) kan kompromittere evnen noen proteaser har til å kløyve innen sløyfene. I dette tilfellet kan det være ønskelig å selekere lengre sløyfer som sannsynligvis er mer tilgjengelige for proteasene. Etter kløyving av sløyfene med endoprotease, kan det videre være ønskelig å forkorte sløyfene ytterligere med andre endoproteaser eller faktisk med eksoproteaser, slik som karboksypeptidaser eller aminopeptidaser.

15 Når målpolypeptidene omfatter flere enn ett slikt proteasesete, er det hensiktsmessig at hvert av setene er mellom to kovalente bindinger laget mellom målpolypeptidet og koblingsforbindelsen. Flere kløyvningsseter kan forekomme mellom bindingene hvis det er nødvendig.

20 I kløyvingsutførelsesformer vil hensiktsmessig opphavspolypeptidet betraktes som en helhet for bedømmelsen om det er festet eller ei til koblingsforbindelsen med minst tre kovalente bindinger. Mer hensiktsmessig vil målpolypeptidet bli betraktet som å være det intakte (ukløyvde) polypeptidet når det bedømmes om det er festet til koblingsforbindelsen eller ei med minst tre kovalente bindinger. Slike ukløyvde polypeptider er vanligvis bisykliske.

## SYNTESE

35 Det bør legges merke til at med en gang polypeptidet av interesse er isolert eller identifisert ifølge foreliggende oppfinnelse, kan så dets påfølgende syntese forenkles der hvor det er mulig. For eksempel kan sekvensen til polypeptidet av

5 interesse bestemmes og den kan produseres syntetisk ved hjelp av standard teknikker etterfulgt av reaksjon med en koblingsforbindelse *in vitro*. Når dette er utført, kan standard kjemi anvendes fordi det ikke lenger er noe behov for å 5 konservere funksjonaliteten eller integriteten til den genetisk kodede bærerpartikkelen. Dette muliggjør den raske storskalafremstillingen av løselig material for ytterligere nedstrømseksperimenter eller validering. Med hensyn til dette kan storskalafremstillingen av kandidatene eller leads identifiseres ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse oppnås ved å anvende konvensjonell kjemi slik som den som er omtalt i Meloen og Timberman.

10

Dermed vedrører foreliggende oppfinnelse også produksjon av polypeptider eller konjugater selektert som satt frem her, hvor produksjonen omfatter valgfrie ytterligere trinn som forklart under. Mest hensiktsmessig utføres disse trinnene på det endelige polypeptid-/konjugatproduktet fremstilt ved kjemisk syntese 15 istedenfor på fagen.

15

Valgfritt kan aminosyrene i polypeptidet av interesse substitueres når et konjugat eller kompleks fremstilles, f.eks. etter det innledende isolerings-/identifikasjonstrinnet.

20

For å illustrere modifikasjonene/tilleggene som er blitt beskrevet, er det nyttig å betrakte eksemplet med seleksjon av et polypeptid som reagere med en reseptor. Det kan være ønskelig å utvide peptidet i den N-terminale eller C-terminale enden. Det kan for eksempel være nyttig å lage en makrosyklisk partikkel som binder seg til et mål med en hale slik som en lineær hale som binder seg til et annet mål for eksempel et cellepenetrerende peptid slik som de som er avledet fra slik som VP22, HIV-Tat, et homeoboksprotein i *Drosophila* (Antennapedia) eller kjemisk utformede proteiner slik som polyarginin eller andre slik som peptider f.eks. beskrevet i (Chen og Harrison Biochemical Society Transactions (2007) Volum 35, del 4, p821 "Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets"). Dette vil ha fordelen av å assistere eller muliggjøre at et makromolekyl som er blitt selektert mot et bestemt mål slik som et intracellulært mål, kan gå inn i en celle.

25

30

35

For å utvide peptidet kan det enkelt gjøres ved enkelt å utvide kjemisk ved dets N-terminale eller C-terminale ende ved å anvende standard fast fase- eller

løsningsfasekjemi. Standard proteinkjemi kan anvendes for å introdusere en  
aktiverbar N-terminal eller C-terminal ende. Alternative tilsetninger kan  
fremstilles ved fragmentkondensering eller nativ kjemisk ligering, f.eks. som  
beskrevet i (Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent, SBH. 1994. Synthesis of  
5 Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779) eller ved hjelp av  
enzymmer, for eksempel ved å anvende subtiligase som beskrevet i (Subtiligase: a  
tool for semisynthesis of proteins Chang TK, Jackson DY, Bumier JP, Wells JA  
Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Dec 20;91 (26):12544-8 eller i Bioorganic &  
10 Medicinal Chemistry letters Tags for labeling protein N-termini with subtiligase  
for proteomics Volum 18, utgave 22. 15. November 2008. Side 6000-6003 Tags  
for labeling protein N-termini with subtiligase for proteomics Hikari A.I.  
Yoshihara, Sami Mahrus og James A. Wells).

Alternativt kan peptider utvides eller modifiseres ved ytterligere konjugering  
15 gjennom disulfidbindinger. Dette har den tilleggsfordelen at det første og andre  
peptidet kan dissosieres fra hverandre en gang innen det reduserende miljøet i  
cellen. I dette tilfellet kan koblingsforbindelsen (f.eks. TBMB) tilsettes under den  
kjemiske syntesen av det første peptidet for å reagere med de tre  
cysteingruppene; en ytterligere cystein kan så festes til den N-terminale enden  
20 til det første peptidet slik at dette cysteinet kun reagerer med et fritt cystein i  
det andre peptidet.

Lignende teknikker brukes likt for syntesen/koblingen av to bisykliske  
25 makroringer.

Videre kan tilsetningen av andre medikamenter oppnås på samme måten ved å  
anvende egnet kjemi, ved å koble ved den N-terminale eller C-terminale enden  
eller via sidekjeder.

Dermed vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet  
30 over som ytterligere omfatter trinnet med å utvide polypeptidet ved en eller flere  
av de N-terminale eller C-terminale endene til polypeptidet.

Dermed omfatter foreliggende oppfinnelse ytterligere en fremgangsmåte som  
35 beskrevet over som ytterligere omfatter trinnet med å konjugere nevnte

kompleks eller nevnte polypeptid-koblingsforbindelsekonjugat til et ytterligere polypeptid.

Dermed vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte som beskrevet ovenfor hvor nevnte konjugering utføres ved

- (i) å tilføye et ytterligere cystein til polypeptidet etter binding til koblingsforbindelsen og
- (ii) å konjugere nevnte polypeptid til nevnte ytterligere polypeptid via disulfidbinding til nevnte ytterligere cystein.

### **GENETISK KODET MANGFOLD**

Polypeptidene av interesse blir hensiktsmessig genetisk kodet for. Dette gir fordelene av økt mangfold sammen med enkel behandling. Det er hensiktsmessig at polypeptidene av interesse blir genetisk kodet for som et fagdisplaybibliotek.

Dermed omfatter komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse en fagpartikkel. Nukleinsyren omfattes av faggenomet. I disse utførelsesformer er polypeptidet omfattet av fagkappen.

I noen utførelsesformer kan foreliggende oppfinnelse anvendes for å fremstille et genetisk kodet kombinasjonsbibliotek av polypeptider som er dannet ved å translaterer nukleinsyrer til korresponderende polypeptider og koble molekylene i nevnte koblingsforbindelse til nevnte polypeptider.

De genetisk kodede kombinasjonsbibliotekene med polypeptider kan genereres med fagdisplay.

Polypeptidene fremvises på fag ifølge etablerte teknikker slik som beskrevet nedenfor. Det er mest hensiktsmessig at slik fremvisning oppnås ved fusjon mellom målpolypeptidet av interesse og et konstruert gen som tillater ekstern fremvisning av polypeptidet av interesse; det er hensiktsmessig at nevnte gen omfatter et konstruert gen 9 (p9 eller gen IX), gen 8 (gen VIII), gen 7 (p7 eller gen VII), gen 6 (p6 eller gen VI) eller gen 3 (p3 eller gen III) av fagen. Disse proteinene gir fordelene av at de inneholder færre eller ingen cysteiner som kan reagere med koblingsforbindelsene slik som TBMB og produsere biprodukter. For

p6 er det fordelaktig å mutere cystein 84 til serin. Cysteinene i p7 og p9 er mest sannsynlig begravd og trenger derfor ikke nødvendigvis å muteres for å fjernes. P8 gir fordelene av at den ikke inneholder en cysteinrest. Dermed er det mest hensiktsmessig at nevnte konstruerte gen omfatter et konstruert gen 8 (gen VIII), gen 6 (gen VI) eller gen 3 (gen III) på fagen.

Mest hensiktsmessig oppnås slik fusjon av målpeptidet av interesse til et konstruert gen 3-protein som mangler cysteinrester i domene 1 og 2. Denne fusjonen kan oppnås ved hjelp av en hvilken som helst egnet teknikk kjent i fagfeltet slik som ved manipulering av nukleinsyren som koder for faggen III-proteinet for å forandre kodonene som koder for cystein til kodon(er) som koder for annen aminosyre(r) og ved å sette inn en aminosyresekvens som koder for målpolypeptidet i den gen III-kodende sekvens i leseramme slik at det blir fremvist som et gen III-fusjonsprotein på utsiden av fagpartikkelen.

Det er en fordel med foreliggende oppfinnelse at det resulterende genet (genene) gjør at fagen fremdeles er infeksøs, dvs. i stand til infeksjon og propagering. Selv når det konstruerte genet er et gen forskjellig fra gen 3 (slik som gen 6 eller gen 8), kan det fremdeles være ønskelig å konstruere gen 3 for å fjerne en eller flere cysteinrester (slik som alle cysteinrestene).

Kodede polypeptidrepertoar som omfatter opp til  $10^{13}$  individuelle medlemmer er blitt generert ved fagdisplay. Antallet individuelle ligander som kan genereres ifølge foreliggende oppfinnelse, overgår klart antallet individuelle molekyler som konvensjonelt analyseres i konvensjonelle screeninger.

Når fag produseres i en bakteriecelle, uttrykkes polypeptidet som en fusjon av kappeproteinet. Ved sammenstilling av en fagpartikkel fremvises polypeptidet på overflaten av fagen. Ved å la et fagrepertoar komme i kontakt med et immobilisert antigen vil noen fag forbli bundet til antigenet mens andre fjernes ved vasking. Fagen kan eluere og propageres. DNA som koder for polypeptidet i selekterte fag kan sekvenseres. Fagdisplay kan anvendes for å kode for mer enn  $10^{10}$  individuelle polypeptider. Et gunstig aspekt av fagdisplay er at den genetiske koden, et enkelttråd DNA, er pakket i en kappe. Kappen kan beskytte DNA fra reaksjon med molekykjernen.

- 5 I en annen foretrukket utførelsesform fremvises polypeptidbiblioteket ifølge foreliggende oppfinnelse på fag som en gen 3-proteinfusjon. Hver fagpartikkel har om lag 3 til 5 kopier av nevnte fagkappeprotein. Som et resultat av fremvisningen av flere kopier av det modifiserte polypeptidet, kan også ligander med mikromolare affiniteter (svake bindere) isoleres i fagseleksjoner. Alternativt blir fagmider anvendt for å redusere antallet polypeptider pr. fag for å unngå grådighetseffekter og selektere ligander med høyere affiniteter.
- 10 I en annen foretrukket utførelsesform blir fag med modifiserte kappeproteiner anvendt til å kode for polypeptidbibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse. Nærmere bestemt blir fag som mangler eller som har et redusert antall av en spesifikk type aminosyre i kappeproteinene, anvendt. Å anvende nevnte kappeproteiner kan være fordelaktig når molekylkjernen er reaktiv mot nevnte spesifikke type aminosyre. Dette er uttrykkelig tilfelle når de funksjonelle gruppene på det fremviste polypeptidet for å kryssbinde en molekylkjerne, er naturlige aminosyrer og den samme typen naturlige aminosyrer er til stede på en overflateeksponert region i fagkappen. Å anvende nevnte fag med modifiserte kappeproteiner kan forhindre kryssbinding av fagpartikler gjennom reaksjon av
- 15 20 aminosyrer fra flere fag med den samme molekylkjernen. I tillegg kan anvendelse av nevnte fag redusere krysskoblingen av begge, aminosyrekjeder i de funksjonelle gruppene i polypeptidet og av fagkappeproteinene til den samme molekylkjernen.
- 25 I enda en annen foretrukket utførelsesform blir fag med et gen 3-protein som mangler cysteinrestene i disulfidbroene C7-C36, C46-C53, C188-C201 i domene 1 og 2, anvendt for å fremvise polypeptidbiblioteker ifølge foreliggende oppfinnelse. En fag med mutasjoner i nevnte posisjoner (C7C, C36I, C46I, C53V, C188V, C201A) og 14 tilleggsmutasjoner i gen 3-proteinet for å kompensere for
- 30 den reduserte termale stabiliteten (T13I, N15G, R29W, N39K, G55A, T56I, 160V, T101I, Q129H, N138G, L198P, F199L, S207L, D209Y) ble generert av Schmidt F. X. og medarbeidere (Kather, I. et al., J. Mol. Biol., 2005). Fag uten tiolgrupper i nevnte mindre kappeprotein er egnet hvis en eller flere av de funksjonelle aminosyrene for å kryssbinde polypeptidet til en molekylkjerne er cysteinrester.
- 35 Fjerning av cysteinrestene i fagkappeproteinene forhindrer deres interferens med nevnte bindingsreaksjon mellom polypeptid og koblingsforbindelse.

Dette eksemplet på fag til anvendelse i foreliggende oppfinnelse blir nå beskrevet i mer detalj.

- 5 Den disulfid-frie fagen til FX Schmid (domene D1-D2) omfatter fd-fag avledet fra vektor fCKCBS (Krebber, C., 1997, J. Mol. Biol.). Vektoren fCKCBS er basert på en fd-fagvektor avledet fra American Type Culture Collection (ATCC: 15669-B2).

- 10 Aminosyresekvensen til domenene 1 og 2 i p3 i villtype fd-fagen er offentlig tilgjengelig, for eksempel i PubMed-databasen. For enklere referanse er et eksempel på sekvens:

**AETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAATGVVVCTGDETCQCYGTWVPIGLA  
IPENEGGGSEG GGGSEGGGSEGGGKPPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEES  
QPLNTFMFQNNRFRNRQGALTYVTGTVTQGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAF  
HSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVNAPSG**

- 15 FX Schmid og medarbeider stabiliserte evolusjonært p3 til denne fagen (Martin, A. and Schmid, FX., 2003, J. Mol. Biol.) ved å mutere 4 aminosyrer. I et etterfølgende arbeid muterte FX Schmid og medarbeidere 6 cysteiner for å eliminere de 3 disulfidbroene og satte inn tilleggsmutasjoner for å kompensere for tap av stabilitet (Kather. I. od Schmid FX., 2005, J. Mol. Biol.). I flere  
20 evolusjonære sykluser genererte de klonene 19, 20, 21 og 23 som alle hadde et disulfidfritt p3 med varierende termale stabiliteter.

- Som forklart i mer detalj i eksempeldelen kan mutanten 21 ("klon 21") fremstilles som beskrevet eller enkelt skaffes tilveie fra FX Schmid og  
25 medarbeidere. Ifølge publikasjonene til FX Schmid inneholder denne klonen de følgende mutasjonene i domenene 1 og 2: C7S, T13I, N15G, R29W, C36I, N39K, C46I, C53V, G55A, T101I, Q129H, C188V, F199L, C201A, D209Y. I tillegg fant vi de følgende mutasjonene i domenene 1 og 2 da vi sekvenserte klonen og sammenlignet sekvensen med villtype fd-fag: P11S og P198L. Uten ønske om å  
30 være bundet til noen bestemt teori antas det at disse mutasjonene allerede var til stede i fagen til vektoren fCKCBS.

Domenene D1 og D2 har følgende aminosyresekvens:

AETVESSLAKSHIEGSFTNVWKDDKTLDWYANYEGILWKATGVVVITGDETQVYATWVPIGLA  
 IPENEGGGSEGGSEGGGGSEGGGKPPPEYGDTPIPGYIYINPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEES  
 HPLNTFMFQNNRFRNRQGALTYVTGTVTGGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDVAF  
 HSGFNEDLLVAEYQGGSSYLPQPPVNA PSG

Et bibliotek kan genereres ved hjelp av fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse.

5

Foreliggende oppfinnelse kan anvendes for å screene etter molekyler eller enheter som binder seg til (eller som influerer binding til) et kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse. Et eksempel på et kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse er et målpolypeptid som har festet til seg en koblingsforbindelse. Et hvilket som helst konvensjonelt screeningsformat kan tilpasses av en fagperson. Det bestemte formatet som anvendes vil være avhengig av målene til operatøren. For eksempel, hvis en høykapasitetsscreening er ønskelig, så vil høy tetthet, raskt omløp og en enkel operasjon være viktigst. Vanlige teknikker slik som fagpanning, mRNA-display og lignende kan benyttes likt på foreliggende oppfinnelse ettersom de benyttes i fagfeltet. Nøkkelfordelene med foreliggende oppfinnelse er den tredoble kovalente bindingen av koblingsforbindelsen til polypeptidet av interesse og det bestemte formatet de resulterende kompleksene screenes i (eller anvendelsen av disse komplekser som kandidatmodulatorer for andre interaksjoner eller i andre screeninger), er et spørsmål om valg for personen som arbeider med foreliggende oppfinnelse.

10

15

20

I en utførelsesform kan screening utføres ved å la et bibliotek generert med fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse komme i kontakt med en målligand og å isolere et eller flere bibliotekmedlemmer som binder nevnte ligand.

25

I en annen utførelsesform blir individuelle medlemmer av nevnte bibliotek satt i kontakt med en målligand i en screening, og medlemmer av nevnte bibliotek som binder til nevnte målligand, blir identifisert.

30

I en annen utførelsesform blir medlemmer av nevnte bibliotek samtidig satt i kontakt med en målligand, og medlemmer av nevnte bibliotek til nevnte ligand blir valgt.

Målliganden(e) kan være et peptid, et protein, et polysakkarid, et lipid, et DNA eller et RNA.

5 Målliganden kan være en reseptor, en reseptorligand, et enzym, et hormon eller et cytokin.

10 Målliganden kan være et prokaryotisk protein, et eukaryotisk protein eller et arkealt protein. Mer spesifikt kan målliganden være et pattedyrprotein eller et insekt protein eller et bakterielt protein eller et sopp-protein eller et viralt protein.

15 Målliganden kan være et enzym slik som en protease. Mer spesifikt kan målliganden være en elastase, plasma kallikrein, katepsin G eller urokinase-type plasminogen aktivator.

20 Det bør legges merke til at foreliggende oppfinnelse også omfatter bibliotekmedlemmer isolert fra en screening ifølge foreliggende oppfinnelse. Egnede screeningsfremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter ytterligere trinnet: å produsere en mengde av liganden isolert som er i stand til å binde seg til komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse. Når screeningen er utført i motsatt format (dvs. når komplekset (kompleksene) ifølge foreliggende oppfinnelse er identifisert i kraft av deres kapasitet til å binde en tilveiebrakt ligand), er det hensiktsmessig at screeningsfremgangsmåte ytterligere omfatter

25 trinnet: å produsere en mengde av komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse som er i stand til å binde til nevnte ligand.

30 Foreliggende oppfinnelse vedrører også bibliotekmedlemmer som er eller som er i stand til å bli isolert ved hjelp av en screening ifølge foreliggende oppfinnelse hvor nevnte medlem deretter dannes/produseres uten ytterligere anvendelse av nukleinsyren som koder for nevnte polypeptid når den er del av komplekset ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel er det hensiktsmessig at fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse ytterligere omfatter tilleggstrinnet med å produsere en mengde av et polypeptid isolert eller

35 identifisert ved hjelp av en fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse ved å feste koblingsforbindelsen til polypeptidet hvor nevnte polypeptid uttrykkes

rekombinant fremstilt i denne utførelsesformen. For eksempel, når polypeptidet fremstilles rekombinant i denne utførelsesformen, kan nukleinsyren som opprinnelig kodet for det som del av et kompleks ifølge foreliggende oppfinnelse, ikke lenger direkte være til stede, men kan ha vært til stede i et intermediat trinn, for eksempel PCR-oppformering eller kloning av den opprinnelige nukleinsyren i komplekset, som fører til produksjon av en templatnukleinsyre som polypeptidet kan syntetiseres fra i dette tilleggstrinnet.

#### **YTTERLIGERE FORDELER**

10 Det er en fordel med foreliggende oppfinnelse at kompleksene i seg selv er i stand til å propagere. Dermed kan kompleksene eller bibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse bli vekst-selektert (gjentakende hvis ønskelig)-anriket. Dette er i motsetning til kjente teknikker som krever å bli utrullet etter en enkel runde med seleksjon.

15 Foreliggende oppfinnelse tillater på en fordelaktig måte å bygge og å screene veldig store biblioteker.

20 Det er hensiktsmessig at koblingsforbindelsen er fleksibel eller rigid, mer hensiktsmessig er koblingsforbindelsen rigid. Dette har fordelene av å gi større molekylbegrensning på produktmolekylet.

25 I noen utførelsesformer begrenser ikke koblingsforbindelsen molekylet bare ved å holde det ved tre eller flere bindinger, men også ved å virke som et skaffold. Aminosyrer i peptidet kan interagere med skaffoldet og danne en kompakt struktur. Dette fenomenet kan også finnes i antistoffer hvor aminosyrene i CDR-ene interagerer med aminosyrene i skaffoldet. Dermed tilveiebringer foreliggende oppfinnelse denne fordelaktige egenskapen for første gang på konjugerte polypeptider slik som de som er omfattet av fagpartikler.

30 I noen utførelsesformer blir koblingsforbindelser med en symmetrisk geometri anvendt. Dette har den fordel at et enkelt produkt blir utbyttet snarere enn produktblandinger (f.eks. isomerer).

35 Syntetiske reaksjoner er blitt etablert for å koble en koblingsforbindelse til et peptid via minst tre kovalente koblinger. Kjente kjemiske reaksjonsbetingelser

kan ikke lett brukes for genetisk kodede peptider. Vi omtaler et sett med spesifikke betingelser som kan anvendes i konjugasjonen mens infektiviteten bevares på en fordelaktig måte.

5 Det er en fordel med oppfinnelsen at direkte avlesning oppnås, nærmere bestemt for en peptid+kjemikal (dvs. peptid+ koblingsforbindelse) kombinasjon.

10 Det er en fordel med foreliggende oppfinnelse at et syntetisk kjemisk bibliotek dannes som er mottagelig for propagering. Med andre ord har kjente teknikker dannet kjemiske biblioteker på måter hvor det ikke er mulig å oppformere/avlese det lille molekylet av interesse på denne måten, dvs. selv når nukleinsyrene har vært til stede i de kjente kjemiske bibliotekene, har ikke vekst/propagering vært mulig, men har heller kun tillatt hybridisering eller andre slike teknikker.

15 Lignende fordeler kommer fra teknikkene beskrevet her, slik som de kjemiske betingelsene anvendt for å forbinde koblingsforbindelsen med polypeptidet som fordelaktig konserverer infektivitet av komplekset når komplekset omfatter en fagpartikkel.

20

#### **YTTERLIGERE ANVENDELSER**

25 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for å generere et genetisk kodet kombinatorisk kjemisk bibliotek som omfatter polypeptider bundet til en molekylkjerne, fremgangsmåten omfatter: (a) å generere et genetisk kodet bibliotek av polypeptider som omfatter funksjonelle grupper som er i stand til å danne kovalente bindinger med en molekylkjerne; (b) å kjemisk koble nevnte bibliotek med nevnte kjerne med minst tre kovalente bindinger.

30 I et bredt spekter vedrører foreliggende oppfinnelse et polypeptid som omfatter en koblingsforbindelse festet til nevnte polypeptid hvor koblingsforbindelsen er festet til polypeptidet med minst tre adskilte kovalente bindinger. Nærmere bestemt vedrører foreliggende oppfinnelse slike polypeptider som kan skaffes tilveie eller blir skaffet tilveie ved hjelp av fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse.

35

Foreliggende oppfinnelse kan også brukes til å utforme og/eller selektere

peptidetterligninger eller små molekyletterligninger for anvendelse som medikamenter eller medikamentmål.

5 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter for å generere genetisk kodede kombinasjonskjemiske biblioteker og for å isolere ligander fra dem.

10 Foreliggende oppfinnelse kan brukes for å identifisere måltreff fra DNA-sekvensering og å identifisere konsensussekvenser i peptidene til de måltreffene og deretter syntetisere peptidene. For eksempel kan et konsensuspeptid utformes ved denne analysen hvor konsensuspeptidet kan ha en aminosyresekvens som ikke nødvendigvis er identisk med noen av treffene gjenvunnet fra screeningsfasen og dette konsensuspeptidet kan så syntetiseres i henhold til foreliggende oppfinnelse.

15 Komplekset omfatter en fagpartikkel.

20 Dermed tilveiebringes en fremgangsmåte for å generere genetisk kodede kombinasjonskjemiske biblioteker hvor nevnte biblioteker omfatter polypeptider bundet til en molekylkjerne via minst tre kovalente bindinger. Biblioteker generert med nevnte fremgangsmåte blir også tilveiebrakt. Videre blir det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å la nevnte biblioteker komme i kontakt med en målligand og å isolere medlemmer som binder til nevnte ligand som er bibliotekmedlemmer generert med nevnte fremgangsmåte.

25 I skarp kontrast til de kjente fremgangsmåtene i WO 2004/077062 og WO 2006/078161, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter for genereringen og analysen av store biblioteker med komplekser. Ifølge WO 2004/077062 og WO 2004/077062 blir kjente fremgangsmåter tilveiebrakt for å produsere og screene hundrevis eller tusenvis forbindelser. Foreliggende  
30 oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter for genetisk kodede forbindelsesbiblioteker. Dette tillater å generere og analysere millioner, milliarder eller flere, individuelle forbindelser.

35 I skarp kontrast til de kjente fremgangsmåtene i WO 2004/077062 og WO 2006/078161 tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter for å bedømme store forbindelsesbiblioteker i en enkel reaksjonsavdeling ved å

anvende *in vitro* seleksjonsprinsipper. I motsetning til forbindelsene generert ifølge WO 2004/077062 og WO 2006/078161, omfatter kompleksene i foreliggende oppfinnelse en nukleinsyre som tillater identifikasjon av de isolerte kompleksene; det er hensiktsmessig at nevnte nukleinsyrer koder for polypeptidene i komplekset.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer betingelser som konsentrasjon av koblingsforbindelse, reaksjonstid, reaksjonstemperatur og lignende som skåner nukleinsyren i komplekset som for eksempel en fagpartikkel og nærmere bestemt skåner infektiviteten til fagpartikkelen. Med andre ord bevarer kjemien presentert her funksjonen av nukleinsyren i komplekset og bevarer den biologiske funksjonen til komplekset. I eksemplet for komplekset som omfatter en fagartikkel, øker kjemien som er presentert her fordelaktig bevarte funksjonaliteter i fagpartikkelen og gjør at det blir mulig eller mer mulig å anvende den i propagering av nukleinsyren etter kompleksdannelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også genetisk kodete kombinasjonsforbindelsesbiblioteker med fremgangsmåtene som er omtalt.

Trisykliske polypeptider forbundet til en koblingsforbindelse er også planlagt. Disse kan dannes for eksempel ved å forbinde den N- og C-terminale enden i et bisyklisk polypeptid forbundet med en koblingsforbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse. På denne måten danner de forbundne N- og C-terminale endene en tredje sløyfe og lager et trisyklisk polypeptid. Det er hensiktsmessig at denne utførelsesform ikke utføres på fag, men det er hensiktsmessig at den utføres på et polypeptid-koblingsforbindelseskonjugat ifølge foreliggende oppfinnelse. Å forbinde den N- og C-terminale enden er et spørsmål om rutinemessig peptidkjemi. I tilfelle det er nødvendig med veiledning, kan den C-terminale enden aktiveres og/eller så kan de N- og C-terminale endene utvides for eksempel ved å tilsette et cystein til hver ende og deretter forbinde dem ved hjelp av disulfidbinding. Alternativt kan forbindingen oppnås ved anvendelse av en linkerregion som er inkorporert inn i den N-/C-terminale enden. Alternativt kan den N- og C-terminale enden forbindes med en konvensjonell peptidbinding. Alternativt kan en hvilken som helst annen egnet måte for å forbinde den N- og C-terminale enden på, benyttes, for eksempel kan N-C-ringdannelse gjøres ved hjelp av standard teknikker, for eksempel som omtalt i Linde et al. Peptide

- Science 90, 671-682 (2008) "Structure-activity relationship and metabolic stability studies of backbone cyclization and N-methylation of melanocortin peptides", eller som i Hess et al. J. Med. Chem. 51, 1026-1034 (2008) "Backbone cyclic peptidomimetic melanocortin-4 receptor agonist as a novel orally administered drug lead for treating obesity". En fordel med slike trisykliske molekyler er at degradering av de frie endene unngås, nærmere bestemt ved eksoproteasevirkning. En annen fordel med et trisyklisk polypeptid av denne art er at den tredje sløyfen vanligvis ikke vil være tilgjengelig for seleksjon (fordi den ikke produseres på fagen, men kun på polypeptid-koblingsforbindelseskonjugatet) og dermed etterlates dets anvendelse til andre slike biologiske funksjoner fremdeles på en fordelaktig måte både sløyfe 2 og 2 for seleksjon/dannelse av spesifisitet. Dermed vedrører foreliggende oppfinnelse også slike trisykliske polypeptider og deres produksjon og anvendelser.
- 5
- 10
- 15 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer ytterligere fremgangsmåter for å la genetisk kodede forbindelsesbiblioteker komme i kontakt med en målligand og for å identifisere ligander som binder til nevnte målligand. De genetisk kodete forbindelsesbibliotekene undersøkes enten med screening eller seleksjonsprosedyrer.
- 20
- I en screeningsprosedyre blir individuelle medlemmer av biblioteket analysert. Flere kopier av et individuelt medlem av biblioteket blir for eksempel inkubert med en målligand. Målliganden immobiliseres før eller etter at kontakt med medlemmene av biblioteket og ubundne medlemmer fjernes ved vasking.
- 25
- Bundne ligander blir for eksempel detektert i en enzymkoblet immunosorbent analyse (ELISA, eng.: "enzyme linked immunosorbent assay"). Aminosyresekvensene til medlemmene i biblioteket som binder til målliganden, bestemmes ved sekvensering av den genetiske koden.
- 30
- I en seleksjonsprosedyre blir flere medlemmer av det kodete forbindelsesbiblioteket satt i kontakt med en målligand. Målliganden immobiliseres før eller etter kontakt med medlemmene i biblioteket og ubundne medlemmer fjernes med vasking. Den genetiske koden til bundne ligander sekvenseres. Valgte ligander propageres alternativt for å utføre ytterligere seleksjonsrunder.
- 35

I en utførelsesform av oppfinnelsen blir forbindelsesbiblioteket kodet for av fagdisplay og seleksjoner utføres ved fagpanning.

5 Målliganden ifølge foreliggende oppfinnelse kan være et protein, et DNA, et RNA eller et polysakkarid. Proteinet kan være en reseptor, et enzym, et hormon, et cytokin eller et viralt protein. En mulig proteinmålligand er en protease hvor nevnte protease kan være elastaseplasmakallikrein, katepsin G eller urokinase-type plasminogenaktivator.

10

Foreliggende oppfinnelse omfatter også medlemmer av de kodede kombinatoriske kjemiske bibliotekene isolert ved hjelp av fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse. Nevnte medlemmer kan produseres med eller uten en genetisk kode festet til seg. I en foretrukket utførelsesform blir nevnte medlemmer som mangler nukleinsyren anvendt som medikament eller medikamentlead.

15

Flere medlemmer av de kodede kombinasjonskjemiske bibliotekene som er i stand til å binde seg til en målligand, ble isolert ved hjelp av en fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse. Nevnte medlemmer er sammensatt av en mesitylenkjerne og et polypeptid med sekvensen  $AC(X)_6C(X)_6CG$ , hvor polypeptidet er bundet til de eksosykliske metylgruppene i kjernen via cysteinrestene som danner tre tioesterbindinger og hvor X står for en naturlig aminosyre, A for alanin, C for cystein og G for glysin. Peptiddelen til nevnte medlemmer kan uttrykkes rekombinant eller syntetiseres kjemisk.

20

25

Inhibitorer av humant plasmakallikrein kan isoleres ved hjelp av fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse fra kombinasjonskjemiske biblioteker ifølge foreliggende oppfinnelse. Nevnte inhibitorer har enten polypeptidsekvensen  $GCSDRFRNCPADEALCG$ ,  $ACSDRFRNCPLWSGTGC$ ,  $ACSTERRYCPIEIFPCG$ ,  $ACAPWRTACYEDLMWCG$ ,  $ACGTGEGRCRVNWTPCG$  eller relaterte sekvenser hvor tiolgruppene i cysteinene er koblet til metisylenkjernene.

30

35

Inhibitorer av humant katepsin G kan isoleres ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse fra kodede kombinasjonskjemiske biblioteker

ifølge foreliggende oppfinnelse. Nevnte inhibitorer har enten polypeptidsekvensene ACEYGDLCGWDPPVCG, ACIFDLGFCHNDWWNCG, ACLRAQEDCVYDRGFCG eller relaterte sekvenser hvor tiolgruppene til cysteinene er koblet til mesitylenkjernene.

5

Inhibitorer av human urokinase-type plasminogenaktivator kan isoleres med fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse fra kodede kombinasjonskjemiske biblioteker ifølge foreliggende oppfinnelse. Nevnte inhibitorer har enten polypeptidsekvensene ACNSRFSGCQIDLLMCG, ACSRYEVDRCRGRGSACG eller relaterte sekvenser hvor tiolgruppene i cysteinene er koblet til mesitylenkjernene.

10

### **BIOLOGISKE MÅL**

Det er viktig å lage og undersøke så mange molekyler som mulig fordi sjansen til å identifisere en ligand med ønskede egenskaper øker når flere molekyler testes. Generelt blir også ligander med høyere affiniteter fremskaffet når større molekylrepertoar analyseres.

15

Forskere evaluerer vanligvis molekyler ved å anvende screening eller seleksjonsfremgangsmåter. Screening er en prosess hvor forbindelsene blir individuelt analysert for deres evne til å modifisere et mål. Screeningprosesser er allsidige og tillater analyseringen av molekylrepertoarer som har et mangfold av strukturer. Screening med individuelle analyser kan imidlertid være tidskrevende og antall unike molekyler som kan testes for binding til et spesifikt mål overskrider generelt ikke  $10^6$  kjemiske enheter. I motsetning til dette tillater generelt seleksjonsfremgangsmåtene testingen av et mye større antall forskjellige molekyler. Dermed er seleksjonsfremgangsmåtene best egnet til anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse. I seleksjonsprosedyrer blir molekylene analysert i et enkelt reaksjonsrør og de med gunstigste egenskaper (dvs. binding) blir fysisk separert fra inaktive molekyler. Seleksjonsstrategier er tilgjengelige som tillater at det genereres og analyseres samtidig flere enn  $10^{13}$  individuelle forbindelser. Eksempler på sterke affinitetsseleksjonsteknikker er fagdisplay, ribosomdisplay, mRNA-display, gjærdisplay, bakteriedisplay eller RNA/DNA-aptamerfremgangsmåter. Disse biologiske *in vitro* seleksjonsfremgangsmåtene har til felles at ligandrepertoarer kodes for av DNA eller RNA. De tillater propageringen og identifikasjonen av selekterte ligander

20

25

30

35

ved sekvensering. Fagdisplayteknologi er for eksempel blitt anvendt for isoleringen av antistoffer med veldig høy bindingsaffinitet til så å si et hvilket som helst mål.

## 5 **INDUSTRIELLE BRUKSOMRÅDER**

Foreliggende oppfinnelse kan brukes til å oppdage molekyler som er anvendbare innenfor feltet biologi, bioteknologi og farmasøytisk vitenskap. Nærmere bestemt vedrører foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter for genereringen av medikamenter og medikamentleads.

10

Foreliggende oppfinnelse omfatter fremgangsmåter for genereringen av genetisk kodede kombinasjonskjemiske biblioteker og fremgangsmåter for isoleringen av medlemmer av nevnte biblioteker. Videre omfatter foreliggende oppfinnelse biblioteker generert med nevnte fremgangsmåter og medlemmer av bibliotekene isolert med nevnte fremgangsmåter.

15

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for genereringen av genetisk kodede kombinatoriske kjemiske biblioteker hvor medlemmene av nevnte biblioteker omfatter en sentral molekylkjerne og flere mangfoldselementer som er tilføyd til nevnte kjerne. Nevnte genetisk kodede biblioteker genereres i to trinn: I det første trinnet blir genetisk kodede polypeptidbiblioteker som omfatter funksjonelle grupper som er i stand til å danne kovalente bindinger med en molekylkjerne, generert. I det andre trinnet blir de genetisk kodede polypeptidbibliotekene kjemisk kryssbundet til nevnte molekylkjerne med minst tre kovalente bindinger.

20

25

Molekyler fra de genetisk kodede kombinasjonskjemiske bibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse har en kjernestruktur som er utvidet med flere tillegg. Ulikt genetisk kodede kombinasjonskjemiske biblioteker som er kjent i fagfeltet, tilveiebringer bibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse molekyler med ikke-lineære, forgrenede arkitekturer. Molekyler med slike forgrenede strukturer er egnet for binding til målligander fordi de kan binde seg til målligander gjennom interaksjon med flere tillegg som peker bort fra en sentral kjerne.

30

35

I motsetning til lineære polymere strukturer har kompleksene ifølge foreliggende oppfinnelse mindre konformasjonsfleksibilitet. I løsning tilpasser de seg kun et

begrenset sett med konformasjoner. Som en konsekvens er ikke binding av nevnte komplekser eller polypeptider til en stor ligand assosiert med et dramatisk tap av entropi og kan resultere i høye bindingsaffiniteter.

5 Polypeptidene i kompleksene/bibliotekene ifølge oppfinnelsen blir genetisk kodet for. Dette tillater at veldig kraftfulle biologisk kodede fremgangsmåter som for eksempel fagdisplay, ribosomdisplay, gjærdisplay, bakteriedisplay eller mRNA-display kan benyttes til deres produksjon, noe som tillater genereringen av ligandbiblioteker som inneholder millioner, milliarder eller flere individuelle medlemmer.

10 Sekvensene i polypeptidtilleggene til medlemmer av de genetisk kodede kombinasjonskjemiske bibliotekene kan varieres. Unntak er aminosyrer som innehar funksjonelle grupper for kryssbinding av polypeptidet til en molekylkjerne som blir forklart i mer detalj her. Polypeptidtilleggene kan omfatte veldig stor kombinasjonsmangfold. Å representere store kombinasjonsrepertoarer er viktig fordi muligheten til å isolere bindere med høy affinitet til målligandene øker med bibliotekstørrelse.

20 Ulikt lineære biopolymerer som polypeptider, DNA- eller RNA-aptamerer, danner ikke kompleksene og medlemmene av de genetisk kodede kombinasjonskjemiske bibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse komplekse tertiære strukturer. Kompleksene og medlemmene av de genetisk kodede kombinasjonskjemiske bibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse har veldig redusert risiko for inaktivering gjennom irreversibel utfolding. Dannelsen av aggregater som skyldes utfolding er dermed på en fordelaktig måte usannsynlig.

30 De genetisk kodede bibliotekene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter på en hensiktsmessig måte minst  $10^5$  individuelle medlemmer. Det er foretrukket at nevnte biblioteker omfatter millioner eller milliarder eller flere individuelle medlemmer. Størrelsen på nevnte biblioteker bestemmes ved hjelp av fremgangsmåtene som anvendes for å koble nukleinsyren som koder for et polypeptid, med det polypeptidet. I en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse blir biologiske fremgangsmåter anvendt for å generere genetisk kodede polypeptidrepertoar. Antallet individuelle medlemmer av

polypeptider som er koblet til den kodete polynuklotidkoden kan overskride  $10^{13}$  avhengig av fremgangsmåtene som anvendes.

5 Foreliggende oppfinnelse blir nå beskrevet ved hjelp av eksempler hvor referanse gjøres til de følgende figurene:

### KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

10 Figur 1 viser genereringen av fagkodete kombinatoriske små kjemiske biblioteker. Et fagkodet peptid med tre cysteiner er bundet til den tre-funksjonelle forbindelsen tris-(brommetyl)benzen i en nukleofil substitusjonsreaksjon.

15 Figur 2 viser bedømmelsen av reaksjonsbetingelsene for å koble fagfremviste peptider til tris-(brommetyl)benzen (TBMB). (A) Molekylmasse til GCGSGCGSGCG-D1-D2 fusjonsprotein før og etter reaksjon med 10  $\mu$ M TBMB i 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM EOTA, pH 8, 20 % ACN ved 30 °C i 1 time bestemt ved massespektrometri. Masseforskjellen til det reagerte og ikke-reagerte peptidfusjonsproteinet korresponderer til massen av den lille molekylkjernen mesitylen. (C) Titre (transduserende enheter) av fag redusert og behandlet med 20 forskjellige konsentrasjoner av TBMB i 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM EDTA, pH 8, 20 % ACN ved 30 °C i 1 time. Titer av fag fra fdg3pOss21 (sort) og fra bibliotek 1 (hvit) er vist.

25 Figur 3 viser fagbibliotekutforming og sekvenser av valgte kloner. (A) Aminosyresekvens av peptidfusjonsproteiner uttrykt ved kloner i bibliotek 1. Ledersekvensen er fjernet ved sekresjon av proteinet ved hjelp av en *E. coli*-protease som etterlater et peptid med en N-terminal alanin, to tilfeldige 6-aminosyresekvenser flankert av tre cysteiner og en Gly-Gly-Ser-Gly-linker som forbinder peptidet til gen-3-proteinet. (B og C) Aminosyresekvenser av kloner 30 selektert med humant plasmakallikrein (B) og katepsin G (C). Inhiberende aktivitet til de TBMB-modifiserte peptid-D1-D2 fusjonsproteinene er indikert. Sekvenslikheter er uthevet med farger.

Figur 4 viser affinitetsmetning av inhibitorer av humant plasmakallikrein. (A) Utforming av bibliotek 2, 3 og 4. I hvert bibliotek har en av peptidsløyfene 35 sekvensen til et konsensusmotiv identifisert i de første seleksjonene og de andre inneholder seks tilfeldige aminosyrer. (B) Aminosyresekvenser til kloner selektert

med humant plasmakallikrein. Alle klonene er avledet fra bibliotek 2. De inhiberende aktivitetene til TBMB-modifiserte peptid-D1-D2 fusjonsproteiner er indikert. Fargene uthever likheter i den andre bindingsløyfen.

5 Figur 5 viser inhibering av humant plasmakallikrein ved TBMB-modifiserte syntetiske peptider. Den inhiberende aktiviteten uttrykkes som den fraksjonelle aktiviteten (graden av inhibering/graden av ikke-inhibering) ved forskjellige inhibitor-konsentrasjoner.

10 Figur 6 viser representativ NMR-løsningsstruktur av TBMB-modifisert peptid PK15 vist som en "pølse"-struktur. Peptidsløyfene er vist i blått (sløyfe 1) og grønt (sløyfe 2). Alfakarbonatomene til aminosyrene i peptidsløyfene og ved de terminale endene er vist som kuler.

15 Figur 7 viser kjemisk reaksjon til tre-funksjonell forbindelse TBMB med peptider som inneholder et eller to cysteiner. (A) Antatt reaksjonsmekanisme av TBMB med et peptid-fusjonsprotein som inneholder to cysteinrester. (B) Massespekter av et peptid-fusjonsprotein som inneholder to cysteiner før og etter reaksjon med TBMB. (C) Antatt reaksjonsmekanisme av TBMB med et peptid-fusjonsprotein som inneholder en cysteinrest. (D) Massespekter av et peptid-fusjonsprotein som inneholder et cystein før og etter reaksjon med TBMB.

20 Figur 8 viser inhibering av kontaktaktivering i humant plasma ved aprotinin og TBMB-modifisert peptid PK15. Effekt av aprotinin (A) og TBMB-modifisert peptid PK15 (B) på trombingenerering utløst av actin. Begge inhibitorer forårsaker dose-avhengig forlengelse av lag-tid sammenlignet med kontrollprøven. (C) Summen av aktivitetene til faktor XIIa og plasmakallikrein ble målt med det kolorimetriske substratet H-D-Pro-Phe-Arg-pNA i humant plasma fra tre 25 forskjellige donorer behandlet med forskjellige konsentrasjoner av inhibitor. Kontaktaktivering ble initiert ved tilsetning av kaolin. Gjennomsnittlige verdier og standardavvik er indikert.

30 Figur 9 viser (a) Genereringen av fagkodede kombinatoriske små kjemiske biblioteker. Et fagkodet peptid med tre cysteiner er bundet til den tre-funksjonelle forbindelsen tris-(brommetyl)benzen i en nukleofil substitusjonsreaksjon. De resulterende kjemiske enhetene kan valgfritt ytterligere modifiseres gjennom enzymatiske reaksjoner. (b) Kjemisk struktur av en makrosyklisk plasmakallikreininhibitor isolert ved fagdisplay (PK15).

35 Figur 10 viser bedømmelse av reaksjonsbetingelsene for å koble fagfremviste peptider til tris-(brommetyl)benzen (TBMB). (a) Molekylmasse av GCGSGCGSGCG-D1-D2 fusjonsprotein før og etter reaksjon med 10  $\mu$ M TBMB i

20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM EDTA, pH 8, 20 % ACN ved 30 °C i 1 time bestemt ved massespektrometri. Masseforskjellen til reagert og ikke-reagert peptid-fusjonsprotein korresponderer til massen av den lille molekylkjernen mesitylen. (b) Titre (transduserende enheter) av fag som ble redusert og behandlet med forskjellige konsentrasjoner av TBMB i 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . 5 mM EDTA, pH 8. 20 % ACN ved 30 °C i 1 time. Titer av fag fra fdg3pOss21 (sort) og fra bibliotek 1 (hvit) er vist.

Figur 11 viser fagbibliotekutforming og sekvenser av selekterte kloner. (a) Aminosyresekvenser av peptid-fusjonsproteiner uttrykt av kloner fra bibliotek 1. Ledersekvensen er fjernet ved utskillelse av proteinet ved en *E. coli*-protease som etterlater et peptid med en N-terminal alanin, to tilfeldige 6-aminosyresekvenser flankert av tre cysteiner og en Gly-Gly-Ser-Gly-linker som forbinder peptidet med humant plasmakallikrein (b) og katepsin G (c). Inhiberende aktiviteter av de TBMB-modifiserte peptid-D1-D2 fusjonsproteinene er indikert. Sekvenslikheter er uthevet med farger.

Figur 12 viser affinitetsmetning av humant plasmakallikreininhibitorer. (a) Utforming av bibliotek 2, 3 og 4. I hvert bibliotek har en av peptidsløyfene sekvensen til et konsensusmotiv identifisert i de første seleksjonene og den andre inneholder seks tilfeldige aminosyrer. (b) Aminosyresekvensene av kloner selektert med humant plasmakallikrein. Alle kloner er avledet fra bibliotek 2. Inhiberingsaktivitetene til TBMB-modifisert peptid-D1-D2 fusjonsprotein er indikert. Fargene uthever sekvenslikheter i den andre bindingssløyfen.

Figur 13 viser inhibering av humant plasmakallikrein ved TBMB-modifiserte syntetiske peptider. Inhiberingsaktiviteten uttrykkes som den fraksjonelle aktiviteten (grad inhibering / grad ikke-inhibering) ved varierende inhibitor-konsentrasjoner. Klonene PK2, PK4, PK6 og PK13 ble isolert i fagseleksjoner ved å anvende bibliotek 1. PK15 er avledet fra bibliotek 2 og er en affinitetsmettet inhibitor.

Figur 14 viser NMR-løsningsstruktur av TBMB-modifisert peptid PK15. Peptidsløyfene er vist i gult (sløyfe 1) og oransje (sløyfe 2). Mesitylenkjernen, de tre cysteinrestene og det terminale alaninet (N-terminal ende) og glysin (C-terminalt) er vist i grått. Ryggradsatomene til peptidet er representert som pølser og sidekjedene til aminosyrene er vist som pinner.

Figur 15 viser kjemisk reaksjon av den tre-funksjonelle forbindelsen TBMB med peptider som inneholder en eller to cysteinrester. (a) Antatt reaksjonsmekanisme av TBMB med et peptid-fusjonsprotein som inneholder to

cysteinrester. (b) Massespekter av et peptid-fusjonsprotein med to cysteiner før og etter reaksjon med TMBM. (c) Antatt reaksjonsmekanisme for TBMB med et peptid-fusjonsprotein som inneholder en cysteinrest og en lysinrest. (d) Massespekter av et peptid-fusjonsprotein med en cysteinrest og en lysinrest før og etter reaksjon med TBMB.

5

Figur 16 viser undertrykkelse av faktor XII aktivering i humant plasma gjennom inhibering av plasmakallikrein med aprotinin eller TBMB-modifisert peptid PK15. Den indre koagulasjonsreaksjonsveien i humant plasma fra tre forskjellige donorer ble startet ved tilsetningen av kaolin. Den negativt ladede overflaten av kaolin aktiverer små mengder faktor XII. Prekallikrein omdannes til kallikrein ved aktivert faktor XII (XIIa) og kallikrein utviser en positiv respons og aktiverer mer faktor XII. Aktiviteten til faktor XII ble målt med det kolorimetriske substratet H-D-Pro-Phe-Arg-pNA. Gjennomsnittlige verdier og standardavvik av faktor XIIa aktivitet er indikert.

10

15

De følgende eksemplene er ment å være illustrative av natur og ikke ment å begrense omfanget av de vedlagte patentkravene.

## EKSEMPLER

20

### Oversikt

I disse eksemplene demonstrer vi produksjon av fagkodede kombinasjonskjemiske biblioteker.

25

Oppdagelsen av syntetiske molekyler med høy affinitet og spesifisitet for biologiske mål er et sentralt problem innen legemiddelforskning. Mens det nylig ble mulig å isolere store molekylstrukturer som antistoffer eller aptamerer for praktisk talt ethvert mål ved å anvende *in vitro* seleksjonsteknikker, er genereringen av små organiske bindere med høye affiniteter fremdeles en stor utfordring. I foreliggende oppfinnelse omtaler vi en strategi for isoleringen av små molekylstrukturer som er bygget opp av en organisk molekylkjerne (koblingsforbindelse) som er dekorert med peptiddeler (f. eks. polypeptid(er)). For enkelthetsskyld ble i disse eksemplene fagdisplayteknologi anvendt for å kode for peptidfraksjonen til de små molekylene, noe som tillot genereringen og seleksjonen av veldig store kombinasjonskjemiske repertoar. Reaksjonsbetingelser ble valgt for selektivt å binde et 17 aminosyrepeptid via tre

35

tioeterbindinger til et benzenmolekyl, men for å skåne kappeproteinene til fagpartiklene. Veldig spesifikke bindere med sub-mikromolare affiniteter ble fremskaffet mot de to humane serinproteasene plasmakallikrein og katepsin G. En affinitetsmettet inhibitor av humant plasmakallikrein med en tilsynelatende  $K_i$  på 1,5 nM undertrykte effektivt kontaktaktivering i humant plasma.

### Bakgrunn for eksemplene

Molekyler med høy affinitet og spesifisitet for biologiske mål er nødvendig for å utvikle effektive og selektive terapier mot en rekke sykdommer. Prosessen med å finne et nytt lite organisk molekyl medikament mot et valgt mål involverer vanligvis screening med høy kapasitet hvor store biblioteker med kjemikalier testes for deres evne til å modifisere målet. Prosessen er imidlertid tidkrevende og dyr og antallet unike molekyler som kan testes mot et spesifikt mål overskrider vanligvis ikke en million kjemiske enheter. Screeningene tilveiebringer ofte leads som så krever ytterligere forbedring enten ved hjelp av empiriske fremgangsmåter eller ved kjemisk utforming. Mer kraftfulle fremgangsmåter for genereringen av bindingsmolekylene er biologisk *in vitro* seleksjonsteknikker som fagdisplay, ribosomdisplay, mRNA-display eller RNA/DNA-aptamerteknikker. De tillater den raske genereringen av store kombinasjonsrepertoar ( $10^9$ - $10^{13}$ ) med polypeptider, RNA eller DNA og den påfølgende isoleringen av bindere med høye affiniteter. Restriksjonene til slike fremgangsmåter for store biopolymerstrukturer som antistoffer eller aptamerer utelukker imidlertid deres anvendelse til å oppdage små molekyler.

For å bruke *in vitro* seleksjon på kombinasjonskjemiske biblioteker er forskjellige fremgangsmåter blitt foreslått for å assosiere organiske molekyler med en tagg som spesifiserer dets struktur. De fleste tilnæringsmåtene foreslo anvendelsen av DNA-tagger for å identifisere de små organiske molekylene etter affinitetsseleksjon. En prosess med parallell kombinasjonssyntese for å kode for individuelle medlemmer av et stort bibliotek med kjemikalier med unike nukleotidsekvenser på kuler, er blitt foreslått (Brenner, S. og Lerner, R. A., PNAS, 1992). Etter at den kjemiske enheten er bundet til målet blir den genetiske koden avkodet ved å sekvensere nukleotidtaggen. En liten samling med organiske molekyler er blitt konjugert til DNA-oligonukleotider og det er blitt utført affinitetsseleksjoner med forskjellige antigener (Doyon, J. B. et al., JACS, 2003). Neri D. og medarbeidere hadde generert store repertoarer med molekyllpar ved selv-sammenstilling av mindre DNA-kodede kjemiske sub-

biblioteker gjennom hybridisering av to DNA-tråder (Melkko, S. et al., Nature Biotechnol., 2004). Metodologien ble vellykket anvendt til affinitetsmetning av små molekylligander. Halpin D. R. og Harris P. B. utviklet en strategi for in vitro evolusjonen til kombinasjonskjemiske biblioteker som involverer oppformeringen av selekterte forbindelser for å utføre flere seleksjonsrunder (Halpin, D. R. og Harbury, P. B., PLOS Biology. 2004). Woiwode T. F. et al. festet biblioteker med syntetiske forbindelser til kappeproteiner på bakteriofagpartikler slik at identiteten til den kjemiske strukturen er kodet for i genomet til fagen (Woiwode, T. F., Chem. & Biol., 2003). Alle disse strategiene som bruker DNA-kodede kjemiske forbindelser har vist seg å være effektive i modelleksperimenter og noen har til og med gitt nye små molekylbindere. Det er imidlertid blitt klart at kodingen av store forbindelsesbiblioteker og oppformeringen av selekterte forbindelser er mye mer krevende enn de ekvivalente prosedyrene i biologiske seleksjonssystemer.

I foreliggende oppfinnelse forklarer vi en strategi for å kode for hybrid peptid – små molekylstrukturer som er bygget av flere polypeptidfragmenter bundet til et sentralt lite organisk molekyl. Peptiddelen kodes for av fagpartikler som tillater genereringen og seleksjonen av veldig store og komplekse forskjelligheter. Vi så for oss de følgende reaksjonsprosedyrene for å koble peptidfragmenter til et lite molekyl (skjematisk fremstilt i figur 1). En kjemisk struktur utstyrt med reaktive grupper inkuberes med et fagfremvist peptid. Spesifikke aminosyrer i peptidet (f.eks. cysteiner) reagerer med de funksjonelle gruppene i det lille molekylet og danner kovalente bindinger hvor en første binding akselererer etterfølgende bindinger. De resulterende molekylene blir så utsatt for affinitetsseleksjoner. Alternativt blir spesifikke bindinger i multisyklusstrukturen enzymatisk kløyd for å fremskaffe små kjemiske strukturer dekorert med adskilte peptidenheter. Festingen av fagfremviste polypeptidrepertoar til små molekylstrukturer ikke er ubetydelig ettersom reaksjonen trenger å være spesifikk og selektiv og gi et enkelt produkt. Det er også hensiktsmessig at reaktantene ikke bør forringe fagpartikkelen. Å koble et lite molekyl via flere seter til et peptid legger videre til et tilleggsnivå av kompleksitet ettersom produktblandinger lett kan genereres eller fagpartikler kan kryssbindes. Faktisk er det ikke kjent noen eksempler på i fagfeltet at et lite molekyl ble koblet til et polypeptid fremvist på fag via mer enn en binding.

## Materialer og fremgangsmåter

### *Kjemisk kobling av peptid-D12 fusjonsproteiner til et kjemisk skaffold*

Domenene D1-D2 i g3p (som omfatter aminosyrerestene 2 til 217 i det modne fd-g3p) med og uten det N-terminalt fuserte peptidet <sup>N</sup>ACGSGCGSGCG<sup>C</sup> ble uttrykt i *E. Coli*. Den pUC119-baserte uttrykksvektoren med en ledersekvens og D1-D2-genet med en C-terminal hekso-histidin-tagg (her kalt pUC119H6D12) ble vennlig gitt av Phil Holliger fra Laboratorium for moelkylærbiologi (Laboratory of molecular biology -LMB) i Cambridge. Et plasmid for uttrykk av D1-D2 med det N-terminale peptidet ble klonet ved PCR oppformering av D1-D2-genet med primerne pepd12ba (som koder for peptidsekvensen) og d12fo og ligering inn i den *Sfil/NotI*-kløyvde pUC119H6D12. Genet for uttrykk av disulfidfritt D1-D2 med totalt 20 aminosyremutanter ble vennlig gitt av Insa Kather og Franz Xaver Schmid fra Universitetet i Bayreuth. Genet ble PCR oppformert fra vektoren fdg3pOss21 med enten primerparet d120ssba/d120ssfo, pepd120ssba/d120ssfo, P2cd120ssba/d120ssfo eller P1cd120ssba/d120ssfo og *Sfil/NotI* ligert inn i pUC119H6D12 for uttrykk av disulfidfri D1-D2 med og uten de N-terminalt fuserte peptidene <sup>N</sup>ACGSGCGSGCG<sup>C</sup>, <sup>N</sup>AGSGCGSGCG<sup>C</sup> eller <sup>N</sup>AGSGKGS<sup>C</sup>. Alle 6 proteinene ble uttrykt i TG1 *E. coli*-celler ved 30 °C i 8 timer og den periplasmatiske fraksjonen ble rensset trinnvis med Ni-affinitetskromatografi og gelfiltrering på en Superdex 75-kolonne i 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,4. Oksyderte sulfhydrylgrupper ble redusert ved inkubasjon av proteinet (1-10 μM) med 1 mM TCEP i 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8 ved 42 °C i 1 t. Reduksjonsmidlet ble fjernet på et vivaspinnfilter som har en MWCO på 10000 (Vivascience. Stonehouse, UK) ved å anvende 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, pH 8 buffer. Tiolgruppene til proteinene reagerte ved å inkubere med 10 μM TBMB i reaksjonsbuffer (20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, pH 8, 20 % ACN) ved 30 °C i 1 t. For fjerning av ikke-reagert TBMB og konsentrering ble proteinet filtrert med et mikrokon YM-30 (Millipore, Bedford, MA). Molekylmassene til proteinene (5-20 μM) ble bestemt ved denaturering i 4 volum 50 % MeOH, 1 % maursyre og analyse på et time of flight-massespektrometer med elektrosprayionisering (Micromass, Milford, MA, USA). Molekylmasser ble fremskaffet ved å opprulle flerladet proteinmassespekter ved å anvende MassLynx versjon 4.1. Utførelsen av den kjemiske modifikasjonsreaksjonen i nærværet av fag ble testet ved tilsetning av PEG-renset fag til en sluttkonsentrasjon på 10<sup>10</sup> t.u. til proteinet før TCEP reduksjon. Fagen ble fjernet ved gelfiltrering med en PD-10 kolonne (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sverige) etter TBMB-reaksjon.

#### *Dannelse av et fagpeptidbibliotek*

5 Genene som koder for et semi-tilfeldig peptid med sekvensen Ala-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys, linkerens Gly-Gly-Ser-Gly og de to disulfidfrie domenene D1 og D2 ble klonet i den riktige orienteringen inn i fagvektoren fd0D12 for å fremskaffe fagbibliotek 1. Vektoren fd0D12, som mangler genene for D1- og D2-  
10 domenene til gen 3 og som har et ekstra *Sfil* restriksjonssete, ble tidligere dannet ved oppformering av hel-plasmid PCR av fdg3pOss21 (Kather, I. et al., J. Mol. Biol., 2005) ved å anvende primeren ecoG3pNba og pelbsfiecofo. Genene som koder for peptidrepertoaret og de to gen 3-domenene ble trinnvis dannet i to etterfølgende PCR-reaksjoner. Først ble genene til D1 og D2 PCR oppformert med de to primerne prepqr og sfi2fo ved å anvende vektoren fdg3pOss21 som et  
15 templat. Deretter ble DNA som koder for de tilfeldige peptidene tilsatt i en PCR-reaksjon ved å anvende primeren sficx6ba og sfi2fo. Ligeringsreaksjonen av 33 og 9 µg *Sfil* kløyvd fd0D12 plasmid og PCR produkt ga  $4,4 \times 10^9$  kolonier på 12 20x20 cm kloramfenikol (30 µg/ml) 2YT plater. Kolonier ble skrapet av platene med 2YT medium supplementert med 15 % glyserol og lagret ved -80 °C. Glyserolstocker ble fortynnet til OD<sub>600</sub>=0,1 i 1 liter 2YT/kloramfenikol (30 µg/ml) kulturer og fag ble uttrykt ved 30 °C over natt (12 til 16 timer).

20

#### *Kjemisk kobling av et fagfremvist peptid til et lite molekyl*

Vanligvis ble  $10^{11}$ - $10^{12}$  t.u. av PEG-renset fag redusert i 20 ml 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8 med 1 mM TCEP ved 42 °C i 1 t. Fagen ble sentrifugert ved 4000 rpm i et vivaspin-20 filter (MWCO på 10'000) for å redusere volumet til 1 ml og vasket to  
25 ganger med 10 ml iskald reaksjonsbuffer (20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, pH 8). Volumet på den reduserte fagen ble justert til 32 ml med reaksjonsbuffer og 8 ml på 50 µM TBMB i ACN ble tilsatt for å gi en sluttkonsentrasjon på 10 µM. Reaksjonen ble inkubert ved 30 °C i 1 t før ikke-reagert TBMB ble fjernet ved presipitering av fagen med 1/5 volum av 20 % PEG, 2,5 M NaCl på is og  
30 sentrifugering ved 4000 rpm i 30 minutter.

#### *Fagseleksjoner med humant plasmakallikrein og katepsin G*

Humant plasmakallikrein (aktivert med faktor XIIa) ble kjøpt fra Innovative Research (Southfield, MI, USA) og biotinyllert ved en konsentrasjon på 1,2 µM med et 5 gangers molart overskudd av Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) i PBS, pH 7,4 / 5 % DMSO ved RT i 1 t. Det biotinyllerte proteinet ble

35

renset på en PD-10 kolonne ved å anvende en buffer av 50 mM NaAc, pH 5,5, 200 mM NaCl. Ferdig biotinyllert humant katepsin G ble kjøpt fra Lee Biosolutions (St. Louis, MI, USA). Biotinyllerte antigener (5 til 20 µg) ble inkubert med 50 µl magnetiske streptavidinkuler (Dyna, M-280 fra Invitrogen, Paisley, UK) i 20 minutter ved 4 °C. De antigenbelagte kulene ble vasket to ganger med vaskebuffer (10 mM Tris-Cl, pH 7,4. 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) og blokkert i 0,5 ml vaskebuffer som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 i 30 minutter. Den kjemisk modifiserte fagen (vanligvis 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> t.u. oppløst i 2 ml vaskebuffer) ble blokkert med 1 ml vaskebuffer som inneholdt 3 % BSA og 0,3 % tween 20. 3 ml blokkert fag ble pipettert til 0,5 ml blokkerte magnetiske kuler og inkubert på et roterende hjul ved RT. Kulene ble vasket 8 ganger med vaskebuffer som inneholdt 0,1 % tween 20 og to ganger med vaskebuffer før inkubering med 100 µl 50 µM glysin, pH 2,2 i 5 minutter. Eluert fag ble overført til 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8 for nøytralisering, inkuberte med 50 ml TG1-celler ved OD<sub>600</sub>=,4 i 90 minutter ved 37 °C og cellene ble platet ut på store 2YT/kloramfenikolplater. To tilleggsrunder med panning ble utført ved å anvende de samme prosedyrene. I den andre runden med seleksjon ble neutravidinbelagte magnetiske kuler anvendt for å forhindre anrikingen av streptavidinspesifikke peptider. Neutravidinkulene ble fremstilt ved å la 0,8 mg neutravidin (Pierce, Rockford, IL, USA) reagere med 0,5 ml tosyl-aktiverte magnetiske kuler (Dyna, M-280 from Invitrogen, Paisley. UK) ifølge produsentens instruksjoner.

#### *Screeningsfremgangsmåte for å identifisere proteaseinhibitorer*

Plasmid DNA av kloner selektert etter den andre og tredje runden med biopanning ble PCR-oppformert i et enkelt rør med primeren 21seqba og flagfo og klonet inn i vektoren pUC119H6D12 ved *Sfil*- og *NotI*-setene for det periplasmatiske uttrykket av peptidene fusert til de disulfid-frie D1- og D2-domenene med en C-terminal FLAG-tagg og en heksa-histidin-tagg. De ligerte plasmidene ble elektroporert inn i TG1-celler og platet ut på 2YT/ampicillin (100 µg/ml)-plater. Kloner som uttrykte det rekombinante proteinet ble identifisert som følger: 1 ml kulturer av 2YT/ampicillin (100 µg/ml) i 96-dype brønns plater ble inokkulert med celler fra individuelle kolonier og inkubert ved 37 °C. Proteinuttrykk ble induert med 1 mM IPTG når kulturene var turbide og platene ble ristet ved 300 rpm ved 30 °C o/n. Cellene ble pelletert ved sentrifugering ved 3500 rpm i 30 minutter, lysert med vaskebuffer som inneholdt 1 mg/ml lysozym

og sentrifugert ved 3500 rpm for å pelletere celledbris. Supernatantene ble overført til 96-brønns polysorplater (Nunc, Roskilde, Danmark) for ikke-spesifikk adsorpsjon. Brønnene ble skylt to ganger med vaskebuffer som inneholdt 0,1 % tween 20 og blokkert med vaskebuffer som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 i 1 t. Anti-FLAG M2-peroksidasekonjugat (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA) ble fortynnet 1:5000 og blokkert i vaskebuffer som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 og tilsatt til platene i 1 t. Brønnen ble vasket (5 ganger med vaskebuffer som inneholdt 0,1 % tween 20 og en gang uten detergent) og den bundne peroksidasen ble detektert med TMB-substrat løsning (eBiosciences. San Diego, USA). Plasmid DNA fra proteinuttrykkende kloner ble sekvensert (Geneservice, Cambridge, UK). Selekterte kloner ble uttrykt i en 800 ml skala og rensert med Ni-affinitetskromatografi og gelfiltrering som beskrevet over. Peptidene ble kjemisk modifisert ved å anvende fremgangsmåten som beskrevet ovenfor og konsentrasjonene av produktene ble bestemt ved å måle den optiske absorpsjonen 280 nm. IC<sub>50</sub> ble målt ved å inkubere forskjellige konsentrasjoner av de modifiserte peptid-fusjonsproteinene (2-gangers fortynninger) med humant plasmakallikrein (0,1 nM) eller katepsin G (20 nM) og bestemme restaktiviteten i 10 mM Tris-Cl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA, 0,01% triton-X100. Human plasmakallikreinaktivitet ble målt med det fluorogene substratet Z-Phe-Arg-AMC (Bachem. Bubendorf, Sveits) ved en konsentrasjon på 100 µM på en Spectromax Gemini fluorescensplateleser (eksitasjon ved 355 nm, emisjon registrert ved 460 nm: Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Human katepsin G-aktivitet ble målt med det kolorimetriske substratet N-Suc-Ala-Ala-Phe-Pro-pNA (Bachem, Bubendorf, Sveits) ved en konsentrasjon på 1 mM med en Spectromax absorpsjonplateleserplate (registrering ved 410 nm; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### *Fagseleksjoner for affinitetsmetning av humane plasmakallikreininhibitorer*

Tre peptidfagbiblioteker ble dannet vesentlig som bibliotek 1 (se over), men ved å anvende den degenererte primeren sficx6abc (bibliotek 2), sficx6abb (bibliotek 3) og sficx6aba (bibliotek 4) istedenfor sficx6ba. Elektroporering av ligeringsreaksjonene inn i TG1 celler ga  $9,5 \times 10^8$  (bibliotek 2),  $1,1 \times 10^9$  (bibliotek 3) og  $1,2 \times 10^9$  (bibliotek 4) transformanter. Fag i hvert bibliotek ble produsert i 1 l kulturer, rensert, slått sammen og reagert med TBMB. Tre runder med panning ble utført vesentlig som i seleksjonene beskrevet ovenfor, men ved å anvende

det biotynlerte plasmakallikrein ved en lavere konsentrasjon (1 nM i den 1 og 2 runden, 200 pM i den 3 runden).

#### *Kjemisk syntese av bisykliske peptider*

5 Peptider med et fritt amin i den N-terminale enden og et amid i den C-terminale enden ble kjemisk syntetisert på en 25 mg skala ved hjelp av fast fase-kjemi (JPT Peptide Technologies, Berlin, Tyskland). De urene peptidene i 1 ml 60 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8 og 30 % ACN (1 mM) reagerte med TBMB (1,2 mM) i 1 t ved RT. Reaksjonsproduktet ble rensert med revers-fase høykapasitet væskechromatografi  
10 (HPLC) ved å anvende en C18-kolonne og gradient eluering med en mobil fase sammensatt av ACN og 0,1 % vandig trifluoreddiksyre (TFA)-løsning ved en strømningshastighet på 2 ml/min. De rensede peptidene ble frysetørket i DMSO eller en buffer av 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl i aktivitetsmålinger.

#### *Aktivitet og spesifisitetmåling av inhibitorer av humant plasmakallikrein*

Inhiberende aktiviteter ( $\text{IC}_{50}$ ) ble bestemt ved å måle restaktiviteter til enzymet ved inkubering (30 min, RT) med forskjellige konsentrasjoner av inhibitor (vanligvis i området fra 10  $\mu\text{M}$  til 0,5 pM). Aktivitetene til humant plasmakallikrein (0,1 nM) og faktor XIa (0,8 nM; Innovative Research, Southfield, MI, USA) ble målt med Z-Phe-Arg-AMC (100  $\mu\text{M}$ ) og aktiviteten til humant trombin (2 nM; Innovative Research, Southfield, MI, USA) med Boc-Phe-Ser-Arg-AMC (100  $\mu\text{M}$ ) i 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 % BSA, 0,01 % triton X-100 og 5 % DMSO. Rekombinant muse plasmakallikrein fra R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) med et signalpeptid  
25 ble proteolytisk aktivert med 0,5 mg/ml termolysin ved 37 °C i 1 t. Aktiviteten til muse plasmakallikrein (3 nM) ble målt med Z-Phe-Arg-AMC (100  $\mu\text{M}$ ) i 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  og 250 mM NaCl, 0,1 % BSA, 0,01 % triton X-100 og 5 % DMSO. Inhibitor hydrolysert i en bindingsløyfe ble generert ved inkubering av TBMB-modifisert peptid PK15 med humant plasmakallikrein ved et  
30 molart forhold på 5:1 i 24 timer ved 37 °C og deretter varmeinaktivering av enzymet ved 60 °C (30 min). Tilsynelatende  $K_i$  verdier ble beregnet ifølge Cheng og Prusoff-ligningen (Cheng, Y. og Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol., 1973).

#### *Måling av kontaktaktivering i humant plasma*

35 Normalt humant plasma fra enkle donorer ble kjøpt fra 3H Biomedical (Uppsala, Sverige). Plasmaet ble sentrifugert ved 1500xg ved 20 °C i 15 minutter for å gi

blodplatefattig plasma (PPP, eng.: "platelet-poor plasma"). Alikvoter av PPP ble lagret i polypropylenrør ved -80 °C. Prøver på 60 µl PPP som inneholdt 5, 50, 500 eller 5000 nM aprotinin (Roche, Mannheim, Tyskland) eller TBMB-modifisert peptid PK15 ble fremstilt. Trombinaktiveringstid ble målt ved 37 °C ved å tilsette

5 20 µl av 1:10 fortynnet aktin FS (Dade Behring, Marburg, Tyskland) og 20 µl av 20 mM hepes buffer pH 7,4, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mg/ml BSA og 1 mM Z-Gly-Gly-Arg-AMC til plasmaprøven og måling av fluorescensintensitet med en fluorescensplateleser (eksitasjon ved 355 nm, emisjon registrering ved 460 nm; PHERAStar, Labtech, Offenburg, Tyskland). Aktivering av faktor XIIa og humant plasmakallikrein ble målt som følger. 2 µg kaolin ble tilsatt til plasmaprøvene, blandet godt og inkubert i 20 minutter ved 37 °C. Prøvene ble fortynnet 250 ganger i 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl. Plasma kallikrein-lignende aktivitet ble målt med det kromogene substratet H-D-Pro-Phe-Arg-pNA (100 µM; Bachem, Bubendorf, Sveits) ved å anvende en absorpsjonsplateleser (absorpsjon ved 450 nm; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

10

15

#### *Strukturbestemmelse av TBMB-modifisert peptid PK15*

1 mg TBMB modifisert peptid PK15 ble oppløst i 550 µl 10 mM deuterert Tris HCl pH 6,6, 150 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> for å fremskaffe en

20 inhibitorkonsentrasjon på 1 mM. Spekter av inhibitoren ble registrert ved 800 MHz (Bruker Avance med TCI kryoprobe). Spektrale tildelinger var basert på TOCSY- og NOESY-spekter. Avstandsbegrensninger var fra NOESY-spekteret. 50 strukturkonformere ble beregnet. Programmet PyMOL ble anvendt i strukturanalyse og visualisering av molekylmodellene.

25

#### **EKSEMPEL 1: FREMSTILLING AV ET KOMPLEKS**

I dette eksempel viser vi hvordan fagfremviste peptider kan festes til små molekyler. Polypeptidet i dette eksemplet er et fagfremvist peptid. Nukleinsyren er omfattet av fagpartikkelen. Koblingsforbindelsen i dette eksempel er et lite

30 molekyl (TBMB i dette eksempel).

Vi anvendte den lille organiske forbindelsen tris-(brommetyl)benzen (TBMB) som et skaffold til å forankre peptider som inneholdt tre cysteinrester (Kemp, D. S. og McNamara, P. E.. J. Org. Chem. 1985; Figur 1B). Halogene alkaner konjugert til et aromatisk skaffold reagerte spesifikt med tiolgrupper i cysteiner i vandig

35 løsemiddel ved romtemperatur (Stefanova, H. I., Biochemistry, 1993). Meloen

og medarbeidere hadde tidligere anvendt brommetylsubstituerte syntetiske skaffold for immobiliseringen av peptider med flere cysteiner (Timmerman. P. et al., ChemBioChem, 2005). De milde betingelsene som trengtes for substitusjonsreaksjonen er egnet til å skåne funksjonaliteten til fagen (Olofsson, L., et al., J. of Molecular Recognition, 1998). Vi valgte cysteiner som forankringspunkter fordi deres sidekjeder har den mest adskilte reaktiviteten innen de 20 naturlige aminosyrene. Cysteinrester er også sjeldne i proteiner på fagkappen (8 cysteiner i pIII, en cystein i pVI, pVII og pIX; Petrenko, V. A. and Smith. G. P., Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery, 2005). Den tredoble rotasjonssymmetrien til TBMB-molekylet sikrer dannelsen av en unik strukturell og romlig isomer ved reaksjon med tre cysteiner i et peptid.

Reaksjonsbetingelsene for modifikasjonen av et peptid på fag ble så utarbeidet. Ettersom det syntes å være vanskelig å detektere det kjemisk modifiserte peptidet på fag med tilgjengelige teknikker, uttrykte vi peptidet  ${}^N\text{GCGSGCGSGCG}^C$  som en N-terminal fusjon med de to løselige domenene D1 og D2 i det underordnede fagkappeproteinet pIII og analyserte molekylvekten av proteinet før og etter reaksjon med TBMB ved hjelp av massespektrometri. Forsøk på selektivt å koble de tre cysteinene i peptidet til skaffoldet, men skåne de tre disulfidbroene til D1- og D2-domenene i pIII (C7-C36, C46-C53, C188-C201) mislyktes. Dette påvirket oss til å ta fordel av et disulfidfritt gen-3-protein som nylig ble utviklet av Schmidt F. X. og medarbeidere (Kather, I. et al., J. Mol. Biol., 2005). Peptidet fusert til det N-terminale domenet av det cysteinfrie gIII-proteinet ble redusert med tris(karboksyetyl)fosfin (TCEP). Ettersom reduksjonsmidlet ble funnet å reagere med brommetylgruppene i TBMB-skaffoldet ble det fjernet før tilsetningen av TBMB til proteinet. Reoksidering av tiolgruppene etter fjerning av TCEP kan forhindres ved avgassing av reaksjonsbufferen og kompleksing av metallioner med 5 mM EDTA. Reaksjon mellom tiolgruppene og TBMB ved forskjellige konsentrasjoner og massespektrometrisk analyse av produktet avslørte at en konsentrasjon på 10  $\mu\text{M}$  TBMB er tilstrekkelig for kvantitativ modifisering av peptidet ved 30 °C i en time. Hovedsakelig ble et produkt dannet med den forventede molekylmasse ( $\Delta$  masse forventet = 114 Da; Figur 2A). Når det disulfidfrie D1-D2 uten et fusjonspeptid ble inkubert med TBMB, ble ikke dens masse forandret og indikerer at ikke-spesifikke reaksjoner med andre aminosyrer ikke skjer.

Tilsetning av fagpartikler til reaksjonene ( $10^{10}$  t.u. pr. milliliter) avslørte at den høye tettheten av fagkappeproteiner i røret ikke hindrer reaksjonen mellom

peptidet og TBMB. Vi fant uventet at reaksjonen mellom TBMB og peptider som inneholder kun to cysteinrester ( $^N\text{AGSG}\underline{\text{C}}\text{GSG}\underline{\text{C}}\text{G}^{\text{C}}\text{-D1-D2}$ ) gir et produkt med en molekylmasse som er i overensstemmelse med reaksjonen mellom den gjenværende brommetylgruppen og det primære aminet i den N-terminale enden (Figur 7A og 7B). På samme måte gir reaksjonen mellom TBMB og et peptid som har et cystein og en lysin ( $^N\text{AGSGK}\underline{\text{G}}\text{SG}\underline{\text{C}}\text{G}^{\text{C}}\text{-D1-D2}$ ) en molekylmasse som forventes når de primære aminene i lysin og den N-terminale enden reagerer med de gjenværende to brommetylgruppene (Figur 7C og 7D).

Dernest fant vi at jo høyere TBMB-konsentrasjonen var, jo færre fag forble infeksjøs (Figur 2B). Ved reaksjonsbetingelser som tillater den kvantitative modifikasjonen av peptidet (10  $\mu\text{M}$  TBMB, 30  $^{\circ}\text{C}$ , reaksjon i 1 time) falt antallet infeksjøs fag med en faktor på 5.

#### Eksempel 2: Screening

15 Dette eksempel viser affinitetsseleksjon av inhibitorer for humant plasmakallikrein og katepsin G.

Muligheten for å selektere fagkodede peptid-småmolekyl hybridstrukturer ble testet ved å anvende de to humane antigenene plasmakallikrein og katepsin G. Et bibliotek med fag som fremviser peptider på det underordnete kappeproteinet pIII med en kompleksitet på  $4,4 \times 10^9$  varianter, ble dannet. Peptidene ble utformet til å ha to sekvenser på seks tilfeldige aminosyrer flankert av tre cysteiner ( $\text{Cys-(Xaa)}_6\text{-Cys-(Xaa)}_6\text{-Cys}$ ; Figur 3A). En alanin ble tilsatt til den N-terminale enden av peptidet for å sikre en korrekt prosessering av signalsekvensen. En Gly-Gly-Ser-Gly-linker ble plassert mellom det tredje cysteinet og gen-3-proteinet. Ettersom fag med det disulfidfrie gen-3-proteinet hadde om lag 100 ganger redusert infektivitet sammenlignet med villtypefag ble store mengder fagpartikler fremstilt. En 1-liters kultur over natten ved 30  $^{\circ}\text{C}$  ga vanligvis  $10^{10}$ - $10^{12}$  infeksjøs partikler. Om lag  $10^{12}$  rensede infeksjøs fagpartikler ble kjemisk modifisert med TBMB-skaffoldet og inkubert med begge de to biotinylerte proteasene. Fag som bandt ble fanget med magnetiske streptavidinkuler og utsatt for to ytterligere seleksjonsrunder. Økende antall fag fanget i den andre eller tredje seleksjonsrunden indikerte at spesifikke bindere ble anrikt. Sekvensering av peptidene avslørte forskjellige konsensussekvenser enten i en eller til og med i begge sløyfene (Figur 3B og 3C). DNA til de selekterte peptidene ble oppformert med populasjons-PCR og satt inn i et nytt

plasmid for periplasmatisk uttrykk av peptidet som D1-D2-fusjonsprotein. Peptid-fusjonsproteiner som enten viste sekvenslikheter med andre kloner eller som ble funnet i flere kopier ble uttrykt, renset, kjemisk modifisert og testet for deres inhibitoriske aktivitet. De beste plasmakallikrein og katepsin G inhibitorene hadde en  $IC_{50}$  på henholdsvis 400 nM (PK2 og PK4) og 100 nM (CG2 og CG4) når de ble testet som en D1-D2-fusjon.

#### Eksempel 3: Screening

I dette eksempel blir affinitetsmetning av humane plasmakallikreininhibitorer beskrevet.

Sammenligningen av aminosyresekvensene til klonene selektert mot humant plasma kallikrein avslørte at forskjellige grupper av kloner hadde høy sekvenslikhet hovedsakelig i en av de potensielle bindingssløyfene. Vi antok at de bisykliske molekylerne hovedsakelig interagererte med den konserverte bindingssløyfen mens sløyfen med forskjellige aminosyresammensetninger ikke var utviklet for optimal interaksjon med proteasen. Derfor ble nye fagbibliotek dannet med peptider som hadde begge deler, en sløyfe med en sekvens av en av de tre konsensusregionene funnet i seleksjonen med plasmakallikrein og en sløyfe med seks tilfeldige aminosyrer (Figur 4A). Fagpanning med høyere seleksjonstrykk ved å anvende lavere antigenkonsentrasjoner (1 nM til 200 pM) ga kloner som hadde en konsensussekvens i den andre interagerende sløyfen (Figur 4B). Inhiberingsanalyse avslørte at  $IC_{50}$  til den beste inhibitoren (PK15) ble forbedret med omlag en faktor på 20 (20 nM) når den ble testet som en D1-D2 fusjon.

#### Eksempel 4: Karakterisering av kompleksene

Aktivitet og spesifisitet av kjemisk syntetiserte inhibitorer blir undersøkt.

Syntetiske peptider av de fire beste humane plasmakallikreininhibitorene isolert i den første seleksjonen (PK2, PK4, PK6, PK13) og av den beste inhibitoren fra affinitetsmetningsseleksjonen (PK15) ble fremstilt ved fast fasesyntese. Peptidene ble utformet til å ha en alanin med en fri aminogruppe i den N-terminale enden og et amidert glysin i den C-terminale enden for å representere nøyaktig ladningen og det kjemiske miljøet til de fagfremviste peptidene. De

syntetiske TBMB-reagerte peptidene ble funnet å ha om lag 10 ganger lavere  $IC_{50}$ -er enn de korresponderende TBMB-reagerte D1-D2-fusjonspeptidene (Tabell A; Figur 5). Den lavere affiniteten til peptidene som D1-D2 kan stamme fra intermolekylbinding av peptidet til gen-3-proteindomener og følgelig en lavere tilsynelatende inhibitor-konsentrasjon. Den tilsynelatende  $K_i$  til TBMB-modifisert peptid PK15 ble beregnet med likningen Cheng og Prusoff og ble funnet å være 1,5 nM (Cheng, Y. and Prusoff, W. H., *Biochem. Pharmacol.*, 1973).  $IC_{50}$ -ene til de lineære, ikke-begrensede peptidene var minst 250 ganger høyere enn de til de TBMB-modifiserte peptidene (Tabell A):

5

10

Tabell A

Klon	Aminosyresekvens	Masse (Da)		$IC_{50}$ (nM)	
		Lineært peptid	Bisyklisk peptid	Lineært peptid	Bisyklisk peptid
PK2	H-ACSDRFRNCPLWSGTCG-NH <sub>2</sub>	1871,2	1985,3	>10000	28,6
PK4	H-ACSTERRYCPPIEIFPCO-NH <sub>2</sub>	1942,9	2055,9	7181	33
PK6	H-ACAPWRTACYEDLMWCG-NN <sub>2</sub>	1974,8	2088,7	5707	21,2
PK13	H-ACGTGEGRCRVNWTTCG-NH <sub>2</sub>	1764,8	1879,1	> 10'000	39,1
PK15	H-ACSDRFRNCPEALCG-NH <sub>2</sub>	1825	1939,4	> 10000	1,7

Massespektrometrisk analyse av inhibitor inkubert med humant plasmakallikrein viste et massefall på 18 Da, noe som tyder på at en peptidbinding i en av sløyfene i inhibatoren var hydrolysert. Den inhiberende aktiviteten ( $IC_{50}$ ) til kallikreinbehandlet inhibitor var imidlertid like god som den til det intakte bisykliske TBMB-modifiserte peptidet PK15.

15

20

Spesifisitetene til de fem inhibitorene ble testet ved å måle den inhiberende aktiviteten mot muse plasmakallikrein (79 % sekvensidentitet) eller de homologe humane serinproteasene faktor XIa (som har den høyeste sekvensidentiteten med humant plasmakallikrein innen de humane

serinproteasene; 63 %) og trombin (36 % sekvensidentitet). Verken muse plasmakallikreinet eller noen av de homologe humane serinproteasene ble inhibert ved den høyeste konsentrasjonen som ble testet (10  $\mu$ M).

Eksempel 5: Anvendelse av enhetene identifisert i fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen

5

I dette eksempel blir inhibering av kontaktaktivering i humant plasma av en human plasmakallikreininhibitor, demonstrert.

Humant plasmakallikrein spiller en nøkkelrolle i de første hendelsene i kontaktaktivering. Evnen TBMB-modifisert peptid PK15 har til å inhibere kontaktaktivering ble testet ved å måle forlengelsen av trombin aktiveringstid i humant plasma i nærværet av forskjellige inhibitor-konsentrasjoner. Trombin er det siste enzymet i aktiveringskaskaden i blodkoagulasjonsreaksjonsveien som aktiveres. Ved 50 nM inhibitor-konsentrasjon forsinket TBMB-modifisert peptid PK15 trombindannelse, mens aprotinin, en 6 kDa proteininhibitor av humant plasmakallikrein ikke hadde noen effekt (Figur 8A og 7B). Ved en inhibitor-konsentrasjon så høy som 5  $\mu$ M var lagtiden for trombinaktivering mer forlenget ved aprotinin enn ved en liten molekylinhibitor. Aprotinin er en bredspekterinhibitor og kan inhibere andre proteaser i den indre reaksjonsveien når den anvendes ved en høy konsentrasjon. I en forskjellig analyse testet vi om TBMB-modifisert peptid PK15 kan undertrykke aktiveringen av faktor XIIa og plasmakallikrein i humant plasma hos tre forskjellige donorer. Aktiveringen av de to proteasene kunne vesentlig undertrykkes ved 5  $\mu$ M TBMB-modifisert peptid PK15. Vi estimerer at omlag en 30 ganger høyere konsentrasjon av aprotinin er nødvendig for å fremskaffe den samme inhiberende effekt. (Figur 8C).

10

15

20

25

Eksempel 6: Strukturbestemmelse av TBMB-modifisert peptid PK15

Konformasjonen til TBMB-modifisert peptid PK15 ble bestemt med 2D  $^1$ H NMR-spektroskopi i vandig løsning ved pH 6,6. Kjemisk skifttildeling ble oppnådd ved hjelp av standard fremgangsmåter. Analyse av NOESY-spekteret tilveiebrakte bevis for en definert ryggradskonformasjon. Verdt å legge merke til er de kjemiske skiftene til de tre protonene i den sentrale benzenringen som kunne oppløses som et resultat av deres forskjellige romlige miljø. Gjennomsnittlige løsningsstrukturer ble beregnet ved å anvende NOESY-avledete avstandsbegrensninger (Figur 6).

30

35

Oppsummering av eksemplene 1 til 6

Vi har vist at oppfinnelsen med referanse til fagdisplayteknologien for å kode for peptidfraksjonen til ikke-naturlige små molekylstrukturer (dvs. komplekser ifølge foreliggende oppfinnelse). Den genetiske kodingen tillater den lette genereringen, seleksjonen og oppformeringen av veldig store kombinasjonsrepertoarer. En stor vanskelighet med denne tilnæringsmåten var å binde de fagkodete peptidrepertoarene til den lille molekylkjernen. Vi utviklet en praktisk strategi og etablerte optimale reaksjonsbetingelser i en rekke eksperimenter. Reagenskonsentrasjoner, løsemiddelsammensetning og reaksjonstemperatur måtte velges med omhu for å feste spesifikke lineære peptider på fag til små molekyler mens fagpartiklene ble skånet. En spesifikk fag med disulfidfrie gen-3-proteiner anvendes for å hjelpe til med å forhindre genereringen av produktblandinger gjennom reaksjonen av små molekyler med cysteinrester på fagkappen.

Vi har valgt humant plasmakallikrein og katepsin G som mål for å teste effektiviteten til *in vitro* seleksjonsteknikker ifølge foreliggende oppfinnelse. Molekyler med affiniteter i det lavere nanomolare området ble isolert mot begge målene og bekreftet at den foreslåtte seleksjonsstrategien og molekylutformingen kan gi bindere med høy affinitet. Når vi analyserte spesifisiteten til de humane plasmakallikreininhibitorene, fant vi at hverken muse plasmakallikrein eller homologe humane plasmaproteaser som faktor XIa eller trombin ble inhibert. Dette funnet var tilfredsstillende fordi genereringen av spesifikke små molekylvekts inhibitorer for humant plasmakallikrein (Young, W. B. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006) og andre humane serinproteaser (oversikt i Abbenante, G. og Fairlie, D. P., *Medicinal Chemistry*, 2005 and Turk, B., *Nature Rev. Drug Discovery*, 2006). Tilgangen av små molekylstrukturer til kjemisk syntese tillater erstatningen av spesifikke aminosyrer med ikke-naturlige byggeblokker og følgelig den ytterligere forbedringen av inhibitorenes affinitet.

Strukturbestemmelse til en av plasmakallikreininhibitorene ved NMR i løsning tydet på at molekylet har en definert ryggradskonformasjon. Som antatt danner den hydrofobe benzenringen kjernen i molekylet. Imidlertid var ingen av aminosyresidekjedene tettpakket med benzenringen for denne bestemte enkle polypeptid-koblingsforbindelsekombinasjonen. Alternativt kan skaffold med

kjemiske strukturer som tilbyr flere muligheter for å interagere med peptidryggraden eller aminosyresidekjedene fordelaktig anvendes for å fremskaffe en tettere pakking av peptidfraksjonen om det er ønskelig. Hydrogenatomene anvendt i 1,3,5-tris-(brommetyl)-benzen-scaffoldet ved ringposisjonene 2, 4 og 6 kunne for eksempel erstattes med tre identiske kjemiske substituentter.

I seleksjonene vist her anvendte vi en molekylutforming hvor et peptid er bundet via tre bindinger til et lite molekylscaffold for å fremskaffe en bisyklisk peptidstruktur. Selvsagt kan dannelsen av alternative molekylarkitekturer hvor peptidsløylene kløyves av proteaser før seleksjon for å fremskaffe små molekyler med adskilte peptideler også anvendes i seleksjons-/screeningsutførelsesformer. Faktisk ble strukturer med to adskilte peptideler generert i dette arbeidet når den TBMB-modifiserte inhibatoren PK15 ble kløyvd av humant plasmakallikrein ved inkubering med enzymet. Det enkelt fordøyde molekylet ble funnet å ha en inhiberende aktivitet som var like god som den til den ikke-hydrolyserte formen. Kløyving av peptidsløylene gir også muligheten for å feste tilleggs kjemiske strukturer til den nakne amino- eller karboksyterminale enden gjennom ytterligere kjemiske reaksjoner.

Vi har bedømt det terapeutiske potensialet til den utviklede humane plasmakallikreininhibitoren ved å teste dens evne til kontaktaktivering i humant plasma. I hjertekirurgi som involverer hjertelungebypass (CPB, eng.: "cardiopulmonary bypass") aktiverer kontakt mellom blod og den artifielle overflaten til CPB-maskinen og slanger flere plasmaproteasereaksjonsveier. Alvorlige komplikasjoner kan resultere i, inkludert systemiske inflammatoriske respons syndrom (SIRS, eng.: "systemic inflammatory response syndrome"), en inflammatorisk tilstand i hele kroppen som kan sette hjerte- og lungefunksjonen hos pasienten i fare (Miller, B. E. et al., J. of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 1997). Plasmakallikrein spiller en nøkkelrolle i de første hendelsene i kontaktaktivering og i oppformeringen av andre proteasereaksjonsveier slik som det fibrinolytiske og koagulasjonssystemet. En vanlig strategi for å undertrykke kontaktaktivering under hjertekirurgi er å blokkere aktiviteten til plasmakallikrein med aprotinin, en 6 kDa bredspekter proteaseinhibitor fra bovint lungevev. Inhibitoren binder plasmakallikrein med en  $K_i$  på 30 nM og avbryter dermed den indre koagulasjonsreaksjonsveien gjennom undertrykkelse

av faktor XII-aktivering. Videre reduserer inhibering av plasmakallikrein omdannelsen av plasminogen til plasmin og reduserer følgelig fibrinolysen og assosiert blødning. Aprotinin er også en direkte inhibitor av plasmin ( $K_i = 3 \text{ nM}$ ). Man tror at direkte inhibering av plasmin er hovedmekanismen bak de antifibrinolytiske effektene som fører til reduksjon av blodtap og reduserte behov for transfusjon. Medikamentet har også alvorlige effekter som anafylakse og nyretoksisitet (oversikt i Mahdy A. M. og Webster N. R., Br. J. Anaesth., 2004). En alternativ plasmakallikreininhibitor basert på det humane kunitzdomene skaffoldet (6 kDa) er nylig utviklet (Markland, W, et al., Biochemistry, 1996). Medikamentet har en signifikant høyere affinitet ( $k_i = 30 \text{ pM}$ ) og spesifisitet for plasmakallikrein og forventes å være mindre immunogent på grunn av dets humane leseramme. Det blir på det nåværende tidspunkt testet i fase 2 kliniske utprøvinger (Dyax Corp., www.dyax.com). Selv om vår nylig utviklede leadinhibitor har om lag 50 ganger lavere affinitet for humant plasmakallikrein enn den produkt kunitzdomene baserte inhibitoren viste det seg at den undertrykte effektivt kontaktaktivering *ex vivo*. Dens mindre størrelse (2 kDa) tillater ikke bare den lette kjemiske syntesen, men minimaliserer også risikoen for immunogene reaksjoner og gjør at forbindelsen er en attraktiv leadinhibitor for utvikling/anvendelse i CPB-operasjoner.

#### Eksempel 7: Ikke-kovalente interaksjoner

Koblingsforbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en ytterligere fordel med å influere/stabilisere eller gi konformasjonsbegrensninger på målpolypeptidet i kraft av ikke-kovalente bindinger som dannes mellom koblingsforbindelsen og målpolypeptidet. Disse blir på en fordelaktig måte tilveiebrakt i tillegg til de kovalente bindingene mellom koblingsforbindelsen og målpolypeptidet.

Det bør legges merke til at slike bindinger og begrensninger ikke tilveiebringes av kjente teknikker i fagfeltet slik som kryssbinding. For det første er kryssbindingsmidler vanligvis for små og/eller for fleksible til å bidra med konformasjonsbegrensning. For det andre er i det spesifikke eksemplet på kjent kryssbinding som er diskutert over (f.eks. Roberts US2003/0236852A1), den toverdige linkerene liten (propyl) og veldig fleksibel ved bevisst utforming, og det er ikke noe bevis for at denne produserte noen ikke-kovalente interaksjoner eller

ga noen konformasjonsbegrensning utover forbindingen av to rester innefor polypeptidet. I alle fall er den kjente kryssbinderen kun toverdig.

5 I dette eksemplet viser vi at fordelaktig ikke-kovalent binding mellom koblingsforbindelsen og målpolypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse er mulig.

10 Strukturen til en human plasmakallikreininhibitor generert ved hjelp av fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse (se eksemplene ovenfor) ble løst med NMR. I den foreslåtte strukturen er flere karbonatomer i tett nærhet (< 4 ångstrøm) til karbonatomene i koblingsforbindelsen. Dette tyder på at ikke-kovalente interaksjoner er til stede, i dette eksemplet hydrofobe interaksjoner, mellom kjernen og polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse.

Disse interaksjoner er:

Ser3 CB	-	Rng C26	3,62 Å
Ser3 CB	-	Rng C2	4,0 Å
Ser3 CB	-	Rng CMe2	3,63 Å
Cys2 CB	-	Rng CMe2	2,56 Å
Cys9 CB	-	Rng C29	3,13 Å
Cys9 CB	-	Rng C9	3,32 Å
Pro10 CG	-	Rng CMe9	3,8 Å
Pro10 CD	-	Rng CMe9	3,13 Å
Cys16 CB	-	Rng C16	3,43 Å
Cys16 CB	-	Rng C26	3,79 Å

15

I tillegg ble hydrogen-hydrogen-interaksjoner mellom hydrogenatomer i polypeptidet og hydrogenatomene i koblingsforbindelsen detektert med <sup>1</sup>H-NMR NOESY-spektroskopi.

20

Flere klasser av ikke-kovalent interaksjon mellom koblingsforbindelsen og målpolypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse blir dermed vist. Disse

tilveiebringer fordelaktig ytterligere konformasjonsbegrensning til polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse.

#### Eksempel 8: Fagkodete kombinasjonsbiblioteker

##### 5 Oversikt

Fagdisplayteknologi har tidligere vist seg å være effektiv for å fremstille terapeutiske antistoffer fra kombinasjonsbiblioteker, men vanskelig å bruke for å fremstille små molekyler som medikament. Her beskriver vi en fagstrategi for seleksjonen av etterlikninger av makrosykliske forbindelser fremstilt av de ikke-ribosomale peptidsyntasene. Peptidrepertoarene ble utformet med tre reaktive cysteinrester, hver med avstand fra hverandre med flere tilfeldige aminosyrer og fusert til fag gen-3-proteinet. Konjugering med en koblingsforbindelse (i dette eksempel tris-(brommetyl)benzen) via de reaktive cysteinrestene genererte repertoarer med peptidkonjugater som ga to peptidsløyfer forankret til en mesitylenkjerne. Gjentakende affinitetsseleksjoner ga flere enzyminhibitorer; etter ytterligere mutagenese og seleksjon isolerte vi en leadinhibitor (PK15) ( $K_i = 1.5 \text{ nM}$ ) spesifikk for humant plasmakallikrein som effektivt avbrøt den indre koagulasjonsreaksjonsveien i humant plasma som ble testet *ex vivo*. Dermed viste dette at denne tilnæringsmåten tilveiebringer en kraftfull måte for å generere og å screene slike makrosykliske etterlikninger.

##### Bakgrunn

Oppdagelsen av nye ligander for reseptor, enzym og nukleinsyremål representerer det første trinnet i utviklingen av terapeutiske medikamenter. For medikamenter basert på små organiske ligander har høy-kapasitet screening (HTS, eng. "high throughput screening") vist seg å være en populær strategi; store biblioteker av forbindelser blir syntetisert (eller kjøpt) og hver forbindelse analysert for binding til målene. Med anvendelsen av roboter er det mulig å screene  $10^5$ - $10^6$  forbindelser pr. dag, men treffene krever vanligvis kjemi for å forbedre deres bindingsaffinitet og målspesifisitet<sup>1,2</sup>. For medikamenter basert på nukleinsyrer, peptider eller proteiner tilbyr biologiske seleksjonsfremgangsmåter en alternativ strategi. Disse fremgangsmåtene (slik som fagdisplay, ribosomdisplay, mRNA-display eller RNA/DNA-aptamerteknologier) er avhengige av (a) å danne et mangfoldig bibliotek hvor fenotypen (binding til mål) til hvert medlem i biblioteket er koblet til dets genotype (det kodende DNA eller RNA) og

(b) en alternativ syklus hvor bibliotekmedlemmene selekteres for binding til målet og deretter oppformerer (ved replikasjon i en vertscelle eller ved kopiering av den kodende nukleinsyren *in vitro*). Ved hver runde med seleksjon blir binderne dermed anriket i forhold til ikke-bindere. Veldig store bibliotek ( $10^9$ - $10^{13}$  medlemmer) kan effektivt screenes med noen få runder seleksjon og leadtreff kan foredles med mutasjon og ytterligere seleksjon<sup>3</sup>. Denne tilnæringsmåten er veldig kraftfull og er blitt anvendt for å danne terapeutiske antistoffer slik som Humira<sup>™</sup> 4.5. Flere forsøk er gjort for å utvikle seleksjonsfremgangsmåter for isoleringen av små organiske ligander. Vanligvis blir DNA anvendt som en tagg som lett kan syntetiseres, sekvenseres, oppformerer og/eller hybridiseres. For eksempel kan små molekyler hver konjugeres til en unik DNA<sup>6</sup> (eller bakteriofag<sup>7</sup>)-tag og konjugatene blandes sammen for å danne et tagget bibliotek av små molekyler. Etter seleksjon av biblioteket mot målet kan de små molekyltreffene identifiseres ved sekvensene til deres (oppformede) tagger. Alternativt kan DNA-taggene introduseres under syntesen av kombinasjonskjemiske biblioteker. For eksempel blir små molekyler og en korresponderende tagg syntetisert parallelt på de samme kulene<sup>8</sup> eller så blir hybridisering av taggen anvendt for å styre den kjemiske synteseruten<sup>9</sup>. Fra slike biblioteker kan synteseruten (og dermed strukturen) til de selekterte treffene utledes fra sekvensen til taggen. Uansett deres oppfinnsomhet lider disse fremgangsmåtene av en felles ulempe: det lille molekylet er koblet til DNA-taggen kun under den første seleksjonsrunden og gjør at gjentakende sykluser er umulige (og begrenser anvendelsen til små biblioteker). Dermed presenterer kjent teknikk flere vanskeligheter.

I dette eksempel viser vi at foreliggende oppfinnelse kan anvendes for kjemisk modifiserte peptider på fag under seleksjonsprosessen<sup>10,11</sup> for å danne etterligninger av peptid makrosykliske forbindelser. Nyere fremgangsmåter er blitt beskrevet for å binde peptider gjennom reaktive sidekjeder (f.eks. cysteiner) til de funksjonelle gruppene i et organisk skaffold<sup>12</sup> og dermed generere polysykliske konjugater som omfatter en organisk kjerne dekorert med peptidsløyfer. Ettersom strukturene minner om de peptid makrosykliske medikamentene utforsket vi muligheten for å danne og å selektere biblioteker med slike konjugater på filamentøs fag (Fig. 9). Mens peptid makroringer vanligvis fremstilles *in vivo* av ikke-ribosomale peptidsyntaser<sup>13,14</sup>, anvender vår strategi ribosomal syntese *in vivo* og deretter kjemisk konjugering *ex vivo*.

## Resultater

Konjugering av organiske skaffold til peptider fremvist på fag

5 Vi anvendte den lille organiske forbindelsen tris-(brommetyl)benzen (TBMB) som et skaffold (koblingsforbindelse) til å forankre peptider som inneholdt tre cysteiner<sup>12,15</sup> (Fig. 9a). Reaksjonen skjer i vandige løsemidler ved romtemperatur og den tredoble rotasjonssymmetrien til TBMB-molekylet sikrer dannelsen av en unik strukturell og romlig isomer.

10 Vi utarbeidet først reaksjonsbetingelsene for konjugering av peptidet <sup>N</sup>GCGSGCGSGCG<sup>C</sup> fusert til de løselige D1-D2 domenene til fagen pIII, molekylvekten av produktene ble analysert med massespektrometri. Vi var imidlertid ikke i stand til selektivt å konjugere de tre cysteinrestene i peptidet med TBMB mens disulfidbroene til D1 og D2 (C7-C36, C46-C53, C188-C201) ble

15 skånet. Dette påvirket oss til å ta fordel av et disulfidfritt gen-3-protein som nylig ble utviklet av Schmidt F. X. og medarbeidere<sup>16</sup>. Peptid-D1-D2 (disulfidfritt) fusjonsproteinet ble redusert med tris-(karboksyetyl)fosfin (TCEP), TCEP ble fjernet og TBMB ble tilsatt. En konsentrasjon på 10 µM TBMB var tilstrekkelig for kvantitativ reaksjon med peptid-fusjonsproteinet ved 30 °C i en time og ga

20 hovedsakelig et produkt med den forventede molekylmassen (Δ masse forventet = 114 Da; Fig. 10a). Ingen produkter ble detektert med (disulfidfritt) D1-D2-proteinet. Uventet fant vi at reaksjon mellom TBMB og peptid-D1-D2 (disulfidfritt)-fusjoner som inneholdt kun to cysteinrester (<sup>N</sup>AGSGCGSGCG<sup>C</sup>-D1-D2) ga et produkt med en molekylmasse i overensstemmelse med reaksjon med

25 begge cysteinene og α-aminogruppen ved den N-terminale enden (Fig. 15a og 15b). På samme måten ga reaksjonen mellom TBMB og peptid-D1-D2 (disulfidfritt)-fusjoner med kun et cystein og en lysin (<sup>N</sup>AGSGKGSGCG<sup>C</sup>-D1-D2) en molekylmasse i overensstemmelse med reaksjonen mellom cysteinet, α-aminogruppen i den N-terminale enden og ε-aminogruppen til lysinet (Fig. 15c

30 og 15d). Ved å ha identifisert egnede betingelser lot vi YBMB reagere med (disulfidfri p3) fag som bar peptidet <sup>N</sup>GCGSGCGSGCG<sup>C</sup>. Dette førte til et lite tap (5 ganger) av faginfektivitet (Fig. 10b).

### *Dannelse av polysykliske peptidbibliotek og affinitetsseleksjon*

35 Vi utformet et bibliotek av peptider som omfatter to sekvenser med seks tilfeldige aminosyrer flankert av tre cysteiner (Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys; Fig.

11a) for fremvisning på (disulfidfri p3) fagen. En alanin ble tilsatt til den N-terminale enden av peptidet for å sikre en korrekt prosessering av signalsekvensen. Gly-Gly-Ser-Gly-linker ble plassert mellom det tredje cysteinet og gen-3-proteinet. Ettersom (disulfidfri p3-) fagen hadde en 100 gangers redusert infektivitet sammenlignet med villtypefagen, ble store mengder fagpartikler produsert fra biblioteket (estimert  $4,4 \times 10^9$  varianter). En 1-liters kultur som inkuberte over natten ved 30 °C ga vanligvis  $10^{11}$ - $10^{12}$  infeksjøs partikler.

Vi testet biblioteket med polysykliske peptider for binding og inhibering av den humane plasmakallikrein og katepsin G. Omlag  $10^{12}$  rensede infeksjøs fagpartikler ble kjemisk modifisert med TBMB og deretter inkubert med biotinylerede målproteiner. Etter fangning på magnetiske streptavidinkuler ble den anrikede fagen behandlet med ytterligere to runder seleksjon, hver runde omfatter oppformering (ved bakteriell infeksjon), kjemisk konjugering og fangning med de biotinylerede målene. Fagtiteret økte etter den andre og tredje runden, noe som tyder på anrikning av spesifikke bindere. DNA som kodet for peptidene ble PCR-oppformert fra den selekterte populasjonen av fag i den tredje runden og ble klonet igjen for periplasmatiske uttrykk som peptid-D1-D2 (disulfidfri D1-D2) fusjonsproteiner og sekvensert. Dette avslørte konsensussekvenser i en eller flere av peptidsløylene (Fig. 11b og 11c) og flere ble uttrykt, rensert, konjugert med TBMB og testet for deres inhiberende aktivitet mot protease. De beste plasmakallikrein- og katepsin G-inhibitorer hadde en  $IC_{50}$  på henholdsvis 400 nM (PK2 og PK4) og 100 nM (CG2 og CG4) når de ble testet som en D1-D2-fusjon. Fordi vi screenet de fagselekterte klonene for inhibering (heller enn binding) kan vi ikke si om også molekylene ble selektert som binder til proteasene, men ikke inhiberer dem. Funnet om at mesteparten av klonene som ble testet etter fagseleksjonen viste inhiberende aktiviteter tyder imidlertid på at hovedsakelig inhibitorer ble selektert.

#### *Affinitetsmetning av humane plasmakallikreininhibitorer*

De fleste sekvensene til kallikreinbindere avslørte konsensussekvenser i en eller flere av peptidsløylene. Tre nye biblioteker ble dannet med en av de tre konsensusregionene i en sløyfe og seks tilfeldige aminosyrer i den andre sløyfen (Fig. 12a). Bibliotekene ble blandet og fagpannet under stringente betingelser (1 nM til 200 pM biotinyleret kallikrein). Den tilfeldige sekvensen

samlet seg til en ny konsensus og ga kloner med konsensussekvenser i begge sløyfene (Fig. 12b). Inhiberingsanalyser avslørte at  $IC_{50}$  til den beste inhibitoren (PK15) var 20 nM når den ble testet som en D1-D2-fusjon.

#### 5 *Aktivitet og spesifisitet til kjemisk syntetiserte inhibitorer*

10 Syntetiske peptider som korresponderer til fire kallikreininhibitorer fra den primære seleksjonen (PK2, PK4, PK6 og PK13) og den beste inhibitoren fra affinitetsmetningsseleksjonen (PK15) ble produsert ved fast fase kjemisk syntese. Peptidene hadde en alanin ved den N-terminale enden og et amidert  
 10 glysin ved den C-terminale enden for å representere ladning og det kjemiske miljøet til de fagfremviste peptidene. TBMB-konjugerte syntetiske peptider var minst 250 ganger mer potente inhibitorer av kallikreinaktivitet enn de ikke-konjugerte peptidene (Tabell 1).

15 Tabell 1 – Kjemisk syntetiserte inhibitorer. Aminosyresekvensene til fem plasmakallikreininhibitorer (17-mer) er vist. Sekvensene til de syntetiske peptidene er avledet fra klonene PK2, PK4, PK6, PK13 (isolert i fagseleksjonene ved å anvende bibliotek 1) og fra klon PK15 (en affinitetsmettet klon isolert fra  
 20 bibliotek 2). Indikert er molekylmassene og de inhiberende aktivitetene før og etter modifikasjonen av peptidene med TBMB:

Opphavs- kloner	Aminosyresekvenser	Masse (Da)		$IC_{50}$ (nM)	
		Lineært peptid	Bisyklisk peptid	Lineært peptid	Bisyklisk peptid
PK2	H-ACSDRFRNCPLWSGTCG-NH <sub>2</sub>	1871,2	1985,3	> 10000	28,6
PK4	H-ACSTERRYCPPIEIFPCG-NH <sub>2</sub>	1942,9	2055,9	7181	33
PK6	H-ACAPWRTACYEDLMWCG-NH <sub>2</sub>	1974,8	2088,7	5707	21,2
PK13	H-ACGTGEGRCRVNWTPCG-NH <sub>2</sub>	1764,8	1879,1	> 10000	39,1
PK15	H-ACSDRFRNCPADEALCG-NH <sub>2</sub>	1825	1939,4	> 10000	1,7

De var mer potente inhibitorer enn peptid-D1-D2-konjugatene med en faktor på mer en ti (Tabell 1; Fig. 13); antagelig skyldes denne bindingen at de konjugerte peptiddelene til D1-D2-delen ble beregnet til å være 1,5 nM ved å anvende ligningen til Cheng and Prusoff<sup>17</sup>. Inkubering av konjugatet PK15 med kallikrein fører til hydrolyse av en peptidbinding etter forlenget inkubasjon (90 % kløyvning etter 24 timer ved 37 °C), som vist ved en massegevinst på 18 Da, men de inhiberende aktivitetene av kløyvde og ukløyvde prøver viste seg å være like (IC<sub>50</sub> på henholdsvis 2,2 nM og 1,6 nM).

De fem inhibitorene ble også testet mot muse plasmakallikrein (79 % sekvensidentitet) eller den homologe humane serinproteasen faktor XIa (63 % sekvensidentitet) og trombin (36 % sekvensidentitet). Ingen inhiberte disse enzymene ved den høyeste konsentrasjonen som ble testet (10 µM).

#### *Avbrudd i den indre koagulasjonsreaksjonsveien av en human plasmakallikreininhibitor*

Humant plasmakallikrein spiller en nøkkelrolle i de første hendelsene i den indre koagulasjonsreaksjonsveien ved å omdanne faktor XII til faktor XIIa som så virker på den eneste proteasen i reaksjonsveien. Vi testet om konjugat PK15 kunne inhibere aktiveringen av faktor XIIa i humane plasmaprøver. Reaksjonsveien ble startet med kaolin og aktiviteten av faktor XIIa ble målt med et kolorimetrisk substrat. Aktiviteten til XIIa ble halvert i nærværet av 160 nM konjugat PK15 (Fig. 16). Som sammenligning var 5 µM aprotinin, en 6 kDa bovin serin protease inhibitor også anvendt klinisk som en plasmakallikreininhibitor (K<sub>i</sub> = 30 nM), nødvendig for å få den samme effekten.

#### *Strukturbestemmelse av TBMB-modifisert PK15*

2D <sup>1</sup>H NMR-spekter av konjugatet PK15 ble registrert og en sekvensspesifikk oppstilling av de kjemiske skiftene av TOCSY- og NOESY-spekter var mulig. En konformasjon av inhibitoren beregnet på de NOESY-avledete avstandsbegrensningene er vist i Figur 14. De to peptidsløyfene er arrangert rundt mesitylenkjernen som de er kovalent festet til, men de interagerer ikke med hverandre. Sløyfene er ikke tettpakket mot kjernen, men flere

karbonatomer i polypeptidet (Cys 9 CB, Cys16 CA, Gly 17 CA) er innenfor 4 Å atomer av molekylkjernen og tyder på at det er noen hydrofobe interaksjoner.

#### Diskusjon av eksempel 8

5 Vi har vist hvordan reaksjonen mellom tris-(brommetyl)benzen (TBMB)<sup>12</sup> og biblioteker med cysteinrike peptider fremvist på filamentøse bakteriofag genererer konjugater (komplekser ifølge foreliggende oppfinnelse) som er ansvarlig for gjentakende seleksjon. Det var en utfordring å konjugere det fremviste peptidet mens fagen ble skånet og vi måtte variere reagenskonsentrasjonene, løsemiddelsammensetningen og reaksjonstemperaturen og også anvende fag som mangler disulfider i gen-3-proteinet. Fra et bibliotek på  $>10^9$  medlemmer og gjentakende seleksjoner lyktes vi i å isolere potente humane plasmakallikreininhibitorer (<2000 Da). Vår leadinhibitor (PK15) med  $K_i = 1,5 \text{ nM}$  avbrøt effektivt den indre koagulasjonsreaksjonsveien i humant plasma testet *ex vivo* og var veldig spesifikk: den inhiberte ikke-muse plasmakallikrein eller de homologe humane plasmaproteasene faktor XIa og trombin.

20 Vårt repertoar ble bygget fra 17-resters peptider med tre cysteiner som hver har en avstand mellom seg på seks tilfeldige aminosyrer. Etter konjugering med TBMB forventes peptidene å danne to seks-resters sløyfer festet til en mesitylenkje, noe som faktisk ble bekreftet av strukturen av PK15 kallikreininhibitoren festet til mesitylenkje (Fig. 14). Slike polysykliske peptider bør ha fordeler over disulfidbundne og lineære peptider. Fordelene med polysykliske peptider i forhold til disulfidbundne peptider er at med en gang de kovalente karbon-svovel bindingene er dannet er de nøytrale for utbytting<sup>18</sup>. Fordelen med polysykliske peptider i forhold til lineære peptider er at de er kryssbundne og mer begrenset. Dette har to hovedkonsenkvenser: (a) begrensede peptider forventes å binde seg tettere til målene (på grunn av det mindre tapet av konformasjontropi). Vår litteraturoversikt over peptidinhibitorer isolert med fagdisplay viser at de fleste inneholder disulfider og har inhiberingskonstanter i det mikromolare området (Tabell 3).

35 Tabell 3: Fagselekterte peptidinhibitorer. Indikert er sekvensene til peptidene, enzymmålene og bindingsaffinitetene. Cysteinene som danner disulfidbroer er understreket.

Mål	Peptidsekvens	Affinitet	Referanse
Prostata-spesifikt antigen (PSA)	<u>C</u> VAY <u>C</u> IEHH <u>C</u> WT <u>C</u>	$K_D = 2,9 \mu\text{M}$	<sup>1</sup>
Humant kallikrein 2	SRFKVWAAAF	$IC_{50} = 3,4 \mu\text{M}$	<sup>2</sup>
Urokinase-type plasminogenaktivator (uPA)	<u>C</u> SWR <u>G</u> LENHR <u>M</u> <u>C</u>	$K_i = 6,7 \mu\text{M}$	<sup>3</sup>
Urokinase-type plasminogenaktivator (uPA)	<u>C</u> PAYSRYLD <u>C</u>	$K_i = 0,4 \mu\text{M}$	<sup>4</sup>
Chymotrypsin	<u>C</u> CF <u>S</u> WR <u>C</u> RC <u>C</u>	$K_i = 1 \mu\text{M}$	<sup>5</sup>
TF-fVII	EEWEVL <u>C</u> WTWET <u>C</u> ER	$IC_{50} = 1,5 \text{ nM}$	<sup>6</sup>
Angiotensin-omdannende enzym 2 (ACE2)	GDYSH <u>C</u> SP <u>L</u> RYYPWW <u>K</u> <u>C</u> TYPDP	$K_i = 2,8 \text{ nM}$	<sup>7</sup>
ErbB-2	<u>K</u> <u>C</u> <u>C</u> Y <u>S</u> L	$K_i = 30 \mu\text{M}$	<sup>8</sup>
Urease	YDFYWW	$IC_{50} = 30 \mu\text{M}$	<sup>9</sup>
Pankreatisk lipase	<u>C</u> QPH <u>P</u> GQ <u>T</u> <u>C</u>	$IC_{50} = 16 \mu\text{M}$	<sup>10</sup>
Beta-laktamase	<u>C</u> VHSPN <u>R</u> E <u>C</u>	$IC_{50} = 9 \mu\text{M}$	<sup>11</sup>
DNase II	<u>C</u> LRLLQWFLW <u>A</u> <u>C</u>	$K_i = 0,2 \mu\text{M}$	<sup>12</sup>

5 Kun to peptidinhibitorer var like potente som PK15; begge inneholdt en disulfidbinding og minst to tryptofanrester<sup>19,20</sup>. Dette tyder på at den begrensede konformasjonen og muligheten for hydrofobe interaksjoner er nøkkelen til disse høye affinitetene; (b) begrensede (og kryssbundne) peptider bør også være mer resistente for kløyvning og/eller inaktivering enn lineære peptider. I vårt arbeid ble faktisk PK15-inhibitoren kløyvd i en av sløyfene etter forlenget inkubering med humant plasmakallikrein, men forble intakt og aktivt.

10

De polysykliske konjugatene er mottagelige for både genetisk og kjemisk

konstruksjon. Molekylvekten til PK15 (1939.4 Da) er høyere enn flere peptid makrosykliske medikamenter (Tabell 2), men det ville være mulig å anvende kortere sløyfer. For eksempel ved å forandre avstanden mellom cysteinene, sløyfelengden kan lett varieres eller det kan til og med settes inn ekstra segmenter i de peptidterminale endene.

5

Tabell 2- størrelsessammenligning av makrosykliske medikamenter

Navn	Syklusstørrelse	Molekylmasse (Da)	Anvendelsesområde
Actinomycin	16, 16	1255,42	antikreft
Amfotericin B	38	924,08	antisopp
Azitromycin	15	748,88	antibiotika
Caspofungin	21	1093,31	antisopp
Cyklosporin	32	1202,61	immunundertrykkelse
Daptomycin	31	1619,71	antibiotika
Erytromycin	14	733,93	antibiotika
Iksabepilon	16	506,70	antikreft
Okreotid	20	1019,24	hormon
Oksytoksin	20	1007,19	hormon
Polymyxin B	23	1301,56	antibiotika
Rapamyzin	29	914,17	immunundertrykkelse
Rifabutin	27	847,01	antibiotika
Vancomycin	16, 16, 12	1449,30	antibiotika

Ytterligere variasjoner kunne inkludere mutagenes av sløyfene (som ved affinitetsmetningen av PK15); proteolytisk kløyvning i en eller flere sløyfer for å generere peptidsegmenter "forgrenet" ved cysteinene; kjemisk konjugering til den nakne peptidterminale enden etter sløyfekløyvning<sup>21</sup>; eller anvendelsen av forskjellige organiske kjerner. For eksempel kunne en større organisk kjerne eller en med flere funksjonelle grupper, interagere mer omfattende med sløyfene eller med målet og kunne også anvendes for å introdusere helt nye funksjoner slik som fluorescens. Hvis disse operasjonene ble utført på det fagfremviste

10

15

konjugatet ville variasjonene være selekterbare ved en gjentagende prosess. Ettersom peptidkonjugatene også er mottagelige for kjemisk syntese kunne ytterligere variasjoner (slik som substitusjon med ikke-naturlige aminosyrer) introduseres syntetisk.

5

Inhibitorer av humant plasmakallikrein blir utviklet klinisk for behandling av arvelig angiodema og hjertebypasskirurgi, men det har vist seg vanskelig å lage små molekyler som er spesifikke for kallikreinet (oversikt i 22, 23). Det faktum at vi så lett fremskaffet en inhibitor med høy affinitet og spesifisitet ved gjentagende seleksjon av polysykliske peptidkonjugater på fag argumenterer godt for denne strategien.

10

#### Materialer og fremgangsmåter

Kjemisk modifikasjon av peptidrepertoarer med TBMB på fag

15

Fagpeptidbiblioteker som er basert på plasmidet fdg3p0ss2116, ble klonet og fremstilt som beskrevet under. Vanligvis ble 1011-1012 t.u. PEG-renset fag redusert i 20 ml 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8 med 1 mM TCEP ved 42 °C i 1 t. Fagen ble sentrifugert ved 4000 rpm i et vivaspin-20 filter (MWCO på 10000) for å redusere volumet av reduksjonsbufferen til 1 ml og vasket to ganger med 10 ml iskald reaksjonsbuffer (20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM EDTA, pH 8). Volumet av den reduserte fagen ble justert til 32 ml med reaksjonsbuffer og 8 ml 50  $\mu\text{M}$  TBMB i ACN ble tilsatt for å fremskaffe en sluttkonsentrasjon av TBMB på 10  $\mu\text{M}$ . Reaksjonen ble inkubert ved 30 °C i 1 t før ikke-reagert TBMB ble fjernet ved presipitering av fagen med 1/5 volum 20 % PEG, 2,5 M NaCl på is og sentrifugering ved 4000 rpm i 30 minutter.

20

25

#### *Fagseleksjoner med humant plasmakallikrein og katepsin G*

Biotinylert humant plasmakallikrein og katepsin G (5 til 20  $\mu\text{g}$ : protokollen som ble anvendt til biotinylering finnes under her) ble blokkert ved inkubering i 0,5 ml vaskebuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 i 30 minutter. Dem kjemisk modifiserte fagen (vanligvis  $10^{10}$ - $10^{11}$  t.u. oppløst i 2 ml vaskebuffer) ble blokkert ved å tilsette 1 ml vaskebuffer som inneholdt 3 % BSA og 0,3 % tween 20 og inkubering i 30 minutter. 3 ml blokkert fag ble pipettert til 0,5 ml blokkert antigen og inkubert i 30 minutter på et roterende hjul ved RT. 50  $\mu\text{l}$  magnetiske streptavidinkuler (Dynal, M-280 fra Invitrogen, Paisley, UK) ble blokkert ved

30

35

inkubering i 0,5 ml vaskebuffer som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 i 30 minutter. De blokkerte kulene ble tilsatt til fag/antigenblandingen og inkuberte i 5 minutter ved RT på et roterende hjul. Kulene ble vasket 8 ganger med vaskebuffer som inneholdt 0,1 % tween 20 og to ganger med vaskebuffer før  
5 inkubering med 100 µl 50 µM glysin, pH 2,2 i 5 minutter. Eluert fag ble overført til 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8 for nøytralisering, inkubert med 50 ml TG1 celler ved  $OD_{600}=0,4$  i 90 minutter ved 37 °C og cellene ble platet ut på store 2YT/kloramfenikol-plater. To tilleggsrunder med panning ble utført ved å anvende den samme fremgangsmåten. I den andre seleksjonsrunden ble  
10 neutravidinbelagte magnetiske kuler anvendt for å forhindre anrikningen av streptavidinspesifikke peptider. Neutravidinkulene ble fremstilt ved å la 0,8 mg neutravidin (Pierce, Rockford, IL, USA) reagere med 0,5 ml tosyl-aktiverte magnetiske kuler (Dynal, M-280 from Invitrogen, Paisley, UK) i henhold til produsentens instruksjoner.

15

#### *Screening av selekterte kloner for inhiberende aktivitet*

Gene som koder for peptider selektert i den andre og tredje runden av biopanning ble klonet inn i en pUC119-basert vektor for uttrykk av peptid-D1-D2-fusjonsproteinene (disulfidfritt D1-D2-protein; klonings- og  
20 uttrykksprosedyrer er beskrevet nedenunder). Oksiderte sulfhydrylgrupper av peptidene ble redusert ved å inkubere proteiner (1-10 µM) med 1 mM TCEP i 20 mM  $NH_4HCO_3$ , pH 8 ved 42 °C i 1 t. Reduksjonsmidlet ble fjernet ved strørrrelsesekklusjonskromatografi med en PD-10 kolonne (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sverige) ved å anvende 20 mM  $NH_4HCO_3$ , 5 mM EDTA, pH 8  
25 buffer. Tiolgruppene i proteinene reagerte ved inkubering med 10 µM TBMB i reaksjonsbuffer (20 mM  $NH_4HCO_3$ , 5 mM EDTA, pH 8, 20 % ACN) ved 30 °C i 1 t. For fjerning av ikke-reagert TBMB og konsentrasjon ble proteinet filtrert med et mikrocon YM-30 (Millipore, Bedford, MA). Konsentrasjonene av produktene ble bestemt ved å måle den optiske absorpsjonen ved 280 nm.  $IC_{50}$  ble målt ved å  
30 inkubere forskjellige konsentrasjoner av de modifiserte peptid-fusjonsproteinene (2 gangers fortykning) med humant plasmakallikrein (0,1 nM) eller katepsin G (20 nM) og å bestemme restaktiviteten i 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 1mM  $CaCl_2$ , 0,1 % BSA, 0,01 % triton-X100. Human plasmakallikreinaktivitet ble målt med det fluorogene substratet Z-Phe-Arg-AMC  
35 (Bachem, Bubendorf, Sveits) ved en konsentrasjon på 100 µM på en Spectramax Gemini fluorescensplateleser (eksitasjon ved 355 nm, emisjon registrert ved 460

nm; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Human katepsin G-aktivitet ble målt med det kolorimetriske substratet N-Suc-Ala-Ala-Phe-Pro-pNA (Bachem, Bubendorf, Sveits) ved en konsentrasjon på 1 mM med en Spectramax absorpsjons plateleser (registrering ved 410 nm; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### *Kjemisk syntese av bisykliske peptider*

Peptider med et fritt amin i den N-terminale enden og et amid i den C-terminale enden ble kjemisk syntetisert på en 25 mg skala ved hjelp av fast fase kjemi (JPT Peptide Technologies, Berlin, Tyskland). De urene peptidene i 1 ml 70 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8 og 30 % ACN (1 mM) reagerte med TBMB (1,2 mM) i 1 t ved RT. Reaksjonsprodukter ble rensset med revers-fase høykapasitetskromatografi (HPLC) ved å anvende en C18 kolonne og gradient eluering med en mobil fase sammensatt av ACN og 0,1 % vandig trefluoreddiksyre (TFA) løsning med en strømningshastighet på 2 ml/min. De rensende peptidene ble frysetørket og oppløst i DMSO eller en buffer av 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl for aktivitetstestinger.

#### *Kloning og uttrykk av peptid-D12 fusjonsproteiner*

Domenene D1-D2 til g3p (som omfatter aminosyrerestene 2 til 217 i det modne fd-g3p) med og uten det N-terminalt fuserte peptidet  $^{\text{N}}\text{ACGSGCGSGCG}^{\text{C}}$  ble uttrykt i E.coli. Den pUC119-baserte uttrykksvektoren med en ledersekvens og D1-D2-genet med en C-terminal hekso-histidin-tagg (her kalt pUC119H6D12) ble vennlig tilveiebrakt av Phil Holliger fra "Laboratory of Molecular Biology (LMB)" i Cambridge. Et plasmid for uttrykk av D1-D2 med det N-terminale peptidet ble klonet med PCR oppformering av D1-D2-genet med primerne pepd12ba (som koder for peptidsekvensen) og d12fo og ligering inn i den *SfiI/NotI*-kuttete pUC119H6D12-vektoren. Genet for uttrykket av disulfid-fri-D1-D2 med totalt 20 aminosyrer ble PCR oppformert fra vektoren fdg3p0ss21 med enten primerparet d120ssba/d120ssfo, pepd120ssba/d120ssfo, P2cd120ssba/d120ssfo eller P1cd120ssba/d120ssfo og *SfiI/NotI* ligert inn i pUC119H6D12 for uttrykk av disulfid-fri-D1-D2 med og uten de N-terminalt fuserte peptidene  $^{\text{N}}\text{ACGSGCGSGCG}^{\text{C}}$ ,  $^{\text{N}}\text{AGSGCGSGCG}^{\text{C}}$  eller  $^{\text{N}}\text{AGSGKSGCG}^{\text{C}}$ . Alle 6 proteinene ble uttrykt i TG1 *E.coli* celler ved 30 °C i 8 timer og den periplasmatiske fraksjonen ble rensset trinnvis ved Ni-affinitetskromatografi og gelfiltrering på en Superdex 75 kolonne i 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 7,4.

### *Massespektrometri analyse av peptid-D12-fusjonsproteiner*

De molekylære massene til proteinene (5-20  $\mu$ M) før og etter modifisering med TBMB ble bestemt ved denaturering av proteinene i 4 volum 50 % MeOH, 1 % maursyre og analysert på et flight of time-massespektrometer med elektroprayonisering (Micromass, Milford, MA, USA). Molekylmassene ble fremskaffet ved opprulling av flere ladede proteinmassespekter ved å anvende MassLynx versjon 4.1.

### 10 *Dannelse av fag peptidbibliotek 1*

Gene som koder for et semi-tilfeldig peptid med sekvensen Ala-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-CYs-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys, linkerens Gly-Gly-Ser-Gly og de to disulfid-frie domenene D1 og D2 ble klonet i rett orientering inn i fagvektoren fd=D12 for å fremskaffe fagbibliotek 1. Vektoren fd0D12 som mangler genene for D1- og D2-domenene i gen 3 og som har et andre *SfiI*-restriksjonssete ble tidligere dannet ved helplasmid oppformering av fdg3p0ss21 ved å anvende primerne ecoG3pNba og pelbsfiecofo. Gene som koder for peptidrepertoaret og de to gen-3 domenene, ble trinnvis dannet i to etterfølgende PCR-reaksjoner. Først ble genet til D1 og D2 PCR-oppformert med de to primerne prepccr og sfi2fo ved å anvende vektoren fdg3p0ss21 som et templat. Deretter ble DNA som koder for tilfeldige peptider tilsatt i en PCR-reaksjon ved å anvende primerne sficx6ba og sfi2fo. Ligeringen av 33 og 9  $\mu$ g *SfiI* kuttet fd0D12 plasmid og PCR-produkt ga  $4,4 \times 10^9$  kolonier på 12 20x20 cm kloramfenikol (30  $\mu$ g/ml) 2YT-plater. Kolonier ble skrapet av platene med 2YT-medium supplementert med 15 % glyserol og lagret ved -80 °C. Glyserolstocker ble fortynnet til OD<sub>600</sub>=0,1 i 1 liter 2YT/kloramfenikol (30  $\mu$ g/ml)-kulturer og fag ble uttrykt ved 30 °C overnatt (12 til 16 timer).

### *Biotinylering av antigener*

Humant plasmakallikrein (aktivert med faktor XIIa) ble kjøpt fra Innovative Research (Southfield, MI, USA) og biotinyllert ved en konsentrasjon på 1,2  $\mu$ M med et 5 gangers molart overskudd av Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) i PBS, pH 7,4 / 5 % DMSO ved RT i 1 t. Det biotinyllerte proteinet ble rensert på en PD-10 kolonne ved å anvende en buffer av 50 mM NaAc, pH 5,5, 200 mM NaCl. Ferdig biotinyllert human katepsin G ble kjøpt fra Lee Biosolutions (St. Louis, MI, USA).

*Subkloning og uttrykksscreening av fagselekterte kloner*

Plasmid-DNA til kloner selektert etter den andre og tredje runden med biopanning ble PCR-oppformert i et enkelt rør med primerne 21seqba og flagfo og klonet inn i vektoren pUC119H6D12 ved *SfiI*- og *NotI*-setene for det periplasmatiske uttrykket av peptidene fusert til de disulfid-frie D1- og D2- domenene med en C-terminal FLAG-tagg og en heksa-histidin-tagg. De ligerte plasmidene ble elektroporert inn i TG1-celler og platet ut på 2YT/ (100 µg/ml)-plater. Kloner som uttrykte det rekombinante proteinet ble identifisert som følger: Medium (2YT med 100 µg/ml ampicillin) i 96-dype brønners plater (1 ml/brønn) ble inokulert med celler fra individuelle kolonier og inkubert ved 37 °C. Proteinuttrykk ble indusert med 1 mM IPTG når kulturene var turbide og platene ble ristet 300 rpm ved 30 °C o/n. Cellene ble pelletert ved sentrifugering ved 3500 rpm i 30 minutter, lysert med vaskebuffer som inneholdt 1 mg/ml lysozym og sentrifugert ved 3500 rpm for å pelletere celle-debris. Supernatantene ble overført til 96-brønners polysorpplater (Nunc, Roskilde, Danmark) for ikke-spesifikk adsorpsjon. Brønnene ble skylt to ganger med vaskebuffer som inneholdt 0,1 % tween 20 og blokkert med vaskebuffer som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 i 1 t. Anti-FLAG M2-peroksidasekonjugat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ble fortynnet 1:5000 og blokkert i vaskebuffer som inneholdt 1 % BSA og 0,1 % tween 20 og tilsatt til platene i 1 t. Brønnene ble vasket (5 ganger med vaskebuffer som inneholdt 0,1 % tween 20 og en gang uten detergent) og den bundne peroksidasen ble detektert med TMB-substratløsning (eBiosciences, San Diego, USA). Plasmid-DNA-et til proteinuttrykkklonene for proteinuttrykk ble sekvensert (Geneservice, Cambridge, UK).

*Affinitetsmetning av humane plasmakallikreininhibitorer*

Tre peptidfagbiblioteker ble dannet vesentlig som bibliotek 1 (se ovenfor), men ved å anvende de degenererte primerne sficx6abc (bibliotek 2), sficx6abb (bibliotek 3) og sficx6aba (bibliotek 4) istedenfor sficx6ba. Elektroporering av ligeringsreaksjonene inn i TG1-celler ga  $9,5 \times 10^8$  (bibliotek 2),  $1,1 \times 10^9$  (bibliotek 3) og  $1,2 \times 10^9$  (bibliotek 4) transformanter. Fag fra hvert bibliotek ble fremstilt i 1 l kulturer, rensert, slått sammen og reagert med TBMB. Tre runder med panning ble utført vesentlig som i seleksjonene beskrevet i material og metode delen, men ved å anvende det biotinylerede humane plasmakallikrein ved en lavere konsentrasjon (1 nM i 1. og 2. runde, 200 pM i den 3. runden).

*Aktivitets- og spesifisitetmåling av humane plasmakallikreininhibitorer*

Inhiberende aktiviteter ( $IC_{50}$ ) ble bestemt ved å måle restaktiviteter til enzymet ved inkubering (30 min, RT) med forskjellige konsentrasjoner av inhibitor (vanligvis i området 10  $\mu$ M til 0,5 nM). Aktivitetene til humant plasmakallikrein (0,1 nM) og faktor XIa (0,8 nM; Innovative Research, Southfield, MI, USA) ble målt med Z-Phe-Arg-AMC (100  $\mu$ M) og aktiviteten til human trombin (2 nM; Innovative Research, Southfield, MI, USA) med Boc-Phe-Ser-Arg-AMC (100  $\mu$ M) i 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % BSA, 0,01 % triton X-100 og 5 % DMSO. Rekombinant muse plasmakallikrein fra R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) med et signalpeptid ble proteolytisk aktivert med 0,5 mg/ml termolysin ved 37 °C i 1 t. Aktiviteten til muse plasmakallikrein (3 nM) ble målt med Z-Phe-Arg-AMC (100  $\mu$ M) i 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub> og 250 mM NaCl, 0,1 % BSA, 0,01 % triton X-100 og 5 % DMSO. Inhibitor hydrolysert i en bindingssløyfe ble generert ved inkubering mellom TBMB-modifisert peptid PK15 og humant plasmakallikrein i et molart forhold på 5:1 i 24 timer ved 37 °C og påfølgende varmeinaktivering av enzymet ved 60 °C (30 min). Tilsynelatende  $K_i$  verdier ble beregnet i henhold til Cheng og Prusoff ligning.

*Måling av faktor XII-aktivering i humant plasma*

Normalt humant plasma fra enkle donorer ble kjøpt fra 3H Biomedical (Uppsala, Sverige). Plasmaet ble sentrifugert ved 1500xg ved 20 °C i 15 minutter for å fremskaffe blodplate-fattig plasma (PPP). Alikvoter av PPP ble lagret i polypropylenrør ved -80 °C. Prøver på 60  $\mu$ l PPP som inneholdt 5, 50, 500 eller 5000 nM aprotinin (Roche, Mannheim, Tyskland) eller TBMB-modifisert peptid PK15 ble fremstilt. Aktivering av faktor XIIa ble målt som følger. 2  $\mu$ g kaolin ble tilsatt til plasmaprøvene, blandet godt og inkubert 20 minutter ved 37 °C. Prøvene ble fortynnet 250 ganger i 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl. Plasmakallikrein-lignende aktivitet ble målt med det kromogene substratet H-D-Pro-Phe-Arg-pNA (100  $\mu$ M; Bachern, Bubendorf, Sveits) ved å anvende en absorpsjonsplateleser (absorpsjon ved 450 nm; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Det samme kromogene substratet gjenkjennes også og modifiseres av plasmakallikrein. Ved inhibitor konsentrasjoner som er nødvendige for å redusere faktor XIIa-aktivitet med 50 % (160 nM for det TBMB-modifiserte peptidet PK15

og 5  $\mu$ M for aprotinin), blir imidlertid plasmakallikreinet vesentlig inhibert og kan ikke måles med substratet.

*Strukturbestemmelse av TBMB-modifisert peptid PK15*

5 1 mg TBMB-modifisert peptid PK15 ble oppløst i 550  $\mu$ l 10 mM deuterert Tris-HCl  
pH 6.6, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> for å fremskaffe en  
inhibitor-konsentrasjon på 1 mM. Spektre av inhibitoren var basert på TOCSY- og  
NOESY-spektre. Det var totalt 199 NOE begrensninger, 77 var inter-rest og 122  
10 intro-rest. Strukturen vist i Figur 6 er den gjennomsnittlige strukturen til 50  
beregnete strukturkonformere. Programmet PyMOL ble anvendt til  
strukturanalyse og visualisering av molekylmodellene.

Referanser for Materialer og fremgangsmåter-delen:

15 Wu. P., Leinonen, J., Koivunen, E., Lankinen, H. & Stenman, U. H. Identification  
of novel prostate-specific antigen-binding peptides modulating its enzyme  
activity. Eur J Biochem 267, 6212-20 (2000).  
Hekim, C. et al. Novel peptide inhibitors of human kallikrein 2. J Biol Chem 281,  
12555-60 (2006).  
Hansen, M. et al. A urokinase-type plasminogen activator-inhibiting cyclic  
20 peptide with an unusual P2 residue and an extended protease binding surface  
demonstrates new modalities for enzyme inhibition. J Biol Chem 280, 38424-37  
(2005).  
Andersen, L. M., Wind, T., Hansen, H. D. & Andreasen, P. A. A cyclic peptidyl  
inhibitor of murine urokinase-type plasminogen activator: changing species  
25 specificity by substitution of a single residue. Biochem J 412, 447-57 (2008).  
Krook, M., Lindbladh, C., Eriksen, J. A. & Mosbach, K. Selection of a cyclic  
nonapeptide inhibitor to alpha-chymotrypsin using a phage display peptide  
library. Mol Divers 3, 149-59 (1997).  
Dennis, M. S. et al. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants.  
30 Nature 404, 465-70 (2000).  
Huang, L. et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. J  
Biol Chem 278, 15532-40 (2003).  
Karasheva, N. G., Glinsky, V. V., Chen, N. X., Komatireddy, R. & Quinn, T. P.  
Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected  
35 from a bacteriophage display library. J Protein Chem 21, 287-96 (2002).

- Houimel, M., Mach, J. P., Corthesy-Theulaz, I., Corthesy, B. & Fisch, I. New inhibitors of *Helicobacter pylori* urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries. *Eur J Biochem* 262, 774-80 (1999).
- 5 Lunder, M., Bratkovic, T., Kreft, S. & Strukelj, B. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. *J Lipid Res* 46, 1512-6 (2005).
- Sanschagrín, F. & Levesque, R. C. A specific peptide inhibitor of the class 8 metallo-beta-lactamase L-1 from *Stenotrophomonas maltophilia* identified using phage display. *J Antimicrob Chemother* 55, 252-5 (2005).
- 10 Sperinde, J. J., Choi, S. J. & Szoka, F. C., Jr. Phage display selection of a peptide DNase II inhibitor that enhances gene delivery. *J Gene Med* 3, 101-8 (2001).
- Referanser til eksempel 8
- Hüser, J. High-Throughput Screening in Drug Discovery (eds. Mannhold, R., Kubinyi, H. & Folkers, G.) (Wiley-VCH, Weinheim, 2006).
- 15 Bleicher, K. H., Böhm, H. J., Müller, K. & Alanine, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2, 369-78 (2003).
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G. Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem* 267, 16007-10 (1992).
- 20 Jaspers, L. S., Roberts, A., Mahler, S. M., Winter, G. & Hoogenboom, H. R. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)* 12, 899-903 (1994).
- Hudson, P. J. & Souriau, C. Engineered antibodies. *Nat Med* 9, 129-34 (2003).
- Doyon, J. B., Snyder, T. M. & Liu, D. R. Highly sensitive in vitro selections for DNA-linked synthetic small molecules with protein binding affinity and specificity. *J Am Chem Soc* 125, 12372-3 (2003).
- 25 Woiwode, T. F. et al. Synthetic compound libraries displayed on the surface of encoded bacteriophage. *Chem Biol* 10, 847-58 (2003).
- Brenner, S. & Lerner, R. A. Encoded combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5381-3 (1992).
- 30 Halpin, D. R. & Harbury, P. B. DNA display II. Genetic manipulation of combinatorial chemistry libraries for small-molecule evolution. *PLoS Biol* 2, E174 (2004).
- Jaspers, L., Bonnert, T. P. & Winter, G. Selection of optical biosensors from chemisynthetic antibody libraries. *Protein Eng Des Sel* 17, 709-13 (2004).
- 35 Jaspers, L. S. A., Winter, G. P., Bonnert, T. P. & Simon, T. M. (PCT/GB94/01422).

- Timmerman, P., Beld, J., Puijk, W. C. & Meloen, R. H. Rapid and quantitative cyclization of multiple peptide loops onto synthetic scaffolds for structural mimicry of protein surfaces. *ChemBiochem* 6, 821-4 (2005).
- 5 Diggers. E. M., Hale, S. P., Lee, J. & Terrett, N. K. The exploration of macrocycles for drug discovery-an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov* 7, 608-24 (2008).
- Wessjohann, L. A., Ruijter, E., Garcia-Rivera, D. & Brandt, W. What can a chemist learn from nature's macrocycles-a brief, conceptual view. *Mol Divers* 9, 171-86 (2005).
- 10 Kemp, D. S. & McNamara, P. E. Conformationally restricted cyclic nonapeptides derived from L-cysteine and LL-3-amino-2-piperidino-6-carboxylic acid (LL-acp), a potent b-tum-inducing dipeptide analogue. *Journal of Organic Chemistry* 50, 5834-5838 (1985).
- Kather, L, Bippes, C. A. & Schmid, F. X. A stable disulfide-free gene-3-protein of phage fd generated by in vitro evolution. *J Mol Biol* 354. 666-78 (2005).
- 15 Cheng, Y. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-108 (1973).
- Cremlyn, R. J. An introduction to organosulfur chemistry (Wiley, 1996).
- 20 Huang, L. et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 278, 15532-40 (2003).
- Dennis, M. S. et al. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature* 404, 465-70 (2000).
- Jackson, D. Y. et al. A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science* 266, 243-7 (1994).
- 25 Abbenante, G. & Fairlie, D. P. Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem* 1, 71-104 (2005).
- Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-99 (2006).
- 30 Melkko, S., Scheuermann, J., Dumelin, C. E. & Neri, D. Encoded self-assembling chemical libraries. *Nat Biotechnol* 22, 568-74 (2004).
- U, S. & Roberts, R. W. A novel strategy for in vitro selection of peptide-drug conjugates. *Chem Biol* 10, 233-9 (2003).
- Millward, S. W., Takahashi, T. T. & Roberts, R. W. A general route for post-translational cyclization of mRNA display libraries. *J Am Chem Soc* 127, 14142-3 (2005).
- 35

Millward, S. W., Fiacco, S., Austin, R. J. & Roberts, R. W. Design of cyclic peptides that bind protein surfaces with antibody-like affinity. ACS Chem Biol 2, 625-34 (2007).

5 Alle publikasjoner som er nevnt i spesifikasjonen ovenfor, er her inkorporert ved referanse. Forskjellige modifikasjoner og variasjoner av de beskrevne aspekt og utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse vil være åpenbare for fagfolk i fagfeltet uten å avvike fra omfanget av foreliggende oppfinnelse. Selv om foreliggende oppfinnelse er blitt beskrevet i sammenheng med spesifikt foretrukne utførelsesformer bør det forstås at oppfinnelsen som det gjøres krav på ikke bør begrenses urimelig til slike spesifikke utførelsesformer. Forskjellige modifikasjoner av de beskrevne måtene for å utføre oppfinnelsen på, noe som er åpenbart for fagfolk i fagfeltet, er faktisk ment å være innenfor omfanget av de følgende patentkravene.

15

Sekvensliste

Sekvens av DNA primere

Nuklease restriksjonssteder er understreket

pepd12ba

5'CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGTGGCTCTGGCTGCGGTTCCGGCTGTGGTGCAG  
AACTGTTGAAAGTTG-3'

20

d12fo

5'-GAGTCATTCTGCGGCCGCATTGACAGGAGGTTGAGGCAGGTC-3'

d120ssba

5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCTGAAACTGTTGAAAGTAG-3'

25

d120ssfo

5'-GAGTCATTCTGCGGCCGCATTGACAGGAGGTTGAGGCAGGTA-3'

pepd120ssba

5'CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGTGGCTCTGGCTGCGGTTCCGGCTGTGGTGCTG  
AACTGTTGAAAGTAG-3'

p2cd120ssba

5'CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGGGCTCTGGCTGCGGTTCCGGCTGTGGT  
GCTGAAACTGTTGAAAGTAG-3'

30

plcd120ssba

5'CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGGGCTCTGGCAAAGGTTCCGGCTGTGGT  
GCTGAAACTGTTGAAAGTAG-3'

ecoG3pNba

5'GCATGAATTCCAGTCAGTACGGCCTCGGGGGCCATGGCTTCTGGTACCCCGGTTAAC  
-3'

pelbsfiucofo

5'GCATGAATTCCGATGACTGAGGCCGGCTGGGCCGCATAGAAAGGAACAACATAAAG  
GAAT-3'

5 prepcrba

5'-GGCGTTCTGGCGCTGAAACTGTTGAAAGTAG-3'

sfi2fo

5'-GAAGCCATGGCCCCGAGGCCCGGACGGAGCATTGACAGG-3'

sficx6ba

5'TATCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGCNNKNNK  
10 NNKNNKNNKNNKTGTGGCGGTTCTGGCGCTG-3'

flagfo

5'CATTCTCGGCCCGCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTGCAGCATTGACAGGAGGTTG  
AGGCAGGTA-3'

sficx6aba

5'TATCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGCCGCGTT  
15 AATGGACCCCGTGTGGCGGTTCTGGCGCTG-3'

15 sficx6abb

5'TATCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGTGGCGCCGTGGCGCACCGCGTGCNN  
KNNKNNKNNKNNKNNKTGTGGCGGTTCTGGCGCTG-3'

sficx6abc

5'TATCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGTAGCGATCGTTTCGTAATTGCNNKNNK  
NNKNNKNNKNNKTGTGGCGGTTCTGGCGCTG-3'

20 Peptidsekvenser er som omtalt i eksempeldelen

Sekvenser av DNA primere i Eksempel 8

Nuklease restriksjonsseter er understreket

pepd12ba	5'-CTCGC <u>GGCCCAGCCGGCC</u> ATGGCAGCCTGTGGTC TGGCTGGGTTCCGGCTGTGGCAGAAAGAGTTG-3'
d12ba	5'-GAGTCATTCT <u>GCGGCCGC</u> ATTGACAGGAGTTGAGGCAGGTA-3'
d120ssba	5'- CATGCCATGACTCGGG <u>CCCCAGCCGGCC</u> ATGGCTGAAACTGTTGAAA GTAG-3'

d120ssba	5'-GAGTCATTCTGCGGCCGGATTGACAAGGAGGTTGAGGCAGGTA-3'
pepd120ssba	5'- CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGTGTCCCTCTCGGCTGCCCTT CCGGCTGTCTGGCTGAAACTGTTGAAAGTAG-3'
p2cd120ssba	5'- CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCGGGCTCTGGCTTGCGGTTCCG GCTGTGCTGAAACGTTGAAAGTAG-3'
plod120ssba	5'- CTCGCGGCCTAGCCGCCATGGCATGGCAGCCCCCTCTGGAAAGGTTT CGGCTCTGGGTCTTGAAGTA-3'
ocog3pttoo	5'- GCATGAATTCCAGTCAGTACGGCCTCGGGCGCCATGGCTTCTGGTACC CCGTTAAC-3'
po	5'GCATGAATTCCGATCCGAGCCGGTGGGCCCATAGGGAAAGGCAACT AAAGGAAT-3'
propotoo	5'-GGCGGTTCTGGCGTGAAACTCTTGAAGTAG-3'
d121o	5'-GAAGCCATGGCCCCGAGGCCCCCGAGCCGAGCATTGACAGG-3'
uficarbo	5'-TATGCGGCCCGCCAGCCGCCATGGCTCGAGCGTGC5'- GAGTCATTCTGCGGCCGCATTGACAGGAGGTTGAGGCAGGTG-3'
nopto	5'-GATTCTGCGGCCGCATTGATAGGAGGTTGAGGCAGGTA-3'
dic	5'-TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCACCTGC GGCCGCATTGACAGGAG GCCCGCATTAAATTGGACCCCGTGTGGCCGGCCCTTCTGGCCGCTG-3'
disc	5'- TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCACCTGCAGCGTTGTGGCGCCGTGG CCAGCGGCTGGC CTGTGGCGCCGTTCTGGCGCCTGG-3'
eficxdssba	5'TATGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGTGTCTAGCGATCGTTTTCGTAA T

**Patentkrav**

1. Kompleks som omfatter en fagpartikkel, der nevnte fagpartikkel omfatter  
(i) en nukleinsyre som koder for et polypeptid;  
5 (ii) polypeptidet uttrykt av nukleinsyren i (i) og fremvist på overflaten til fagen;  
(iii) en koblingsforbindelse festet til nevnte polypeptid  
hvor nevnte koblingsforbindelse er festet til polypeptidet med minst tre  
adskilte kovalente bindinger.
- 10 2. Kompleks ifølge krav 1, hvor koblingsforbindelsen har molekylsymmetri som  
korresponderer til antall kovalente bindinger som det er festet med til  
polypeptidet.
- 15 3. Kompleks ifølge krav 2, hvor koblingsforbindelsen innehar tredobbel  
molekylsymmetri og koblingsforbindelsen er festet til polypeptidet med tre  
kovalente bindinger.
- 20 4. Kompleks ifølge et hvilket som helst av de foregående patentkrav, hvor  
koblingsforbindelsen omfatter en strukturelt rigid kjemisk gruppe.
5. Kompleks ifølge krav 4, hvor koblingsforbindelsen omfatter tris-  
(brommetyl)benzen (TBMB).
- 25 6. Kompleks ifølge et hvilket som helst av de foregående patentkrav, hvor  
nevnte polypeptid omfatter en cysteinrest og hvor minst en av de nevnte tre  
adskilte kovalente bindingene for å feste nevnte koblingsforbindelse til  
polypeptidet, omfatter en binding til nevnte cysteinrest.
- 30 7. Genetisk kodet polypeptidbibliotek, som omfatter minst to forskjellige  
komplekser ifølge et hvilket som helst av de foregående patentkrav.
8. Fremgangsmåte for å fremstille et kompleks, der nevnte fremgangsmåte  
omfatter  
(i) å tilveiebringe en fagpartikkel som omfatter en nukleinsyre og et polypeptid  
35 uttrykt ved nukleinsyren og fremvist på fagpartikkelen;  
(ii) å tilveiebringe en koblingsforbindelse

(iii) å feste nevnte koblingsforbindelse til nevnte polypeptid ved dannelse av minst tre kovalente bindinger mellom nevnte koblingsforbindelse og polypeptid.

5 9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor de reaktive gruppene i polypeptidet fremvist på fagpartikkelen er redusert og hvor fagpartikkelen som fremviser polypeptidet som omfatter reduserte reaktive grupper, renses ved filtrering før trinn (iii).

10 10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor polypeptidet etter filtreringsrensetrinnet opprettholdes i den reduserte tilstanden for binding til koblingsforbindelsen ved inkubering i avgasset buffer og i nærvær av chelateringsmiddel.

15 11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, hvor trinn (iii) omfatter inkubering av polypeptidet og koblingsforbindelsen sammen ved 30 °C ved pH 8 i vandig buffer som omfatter acetonitril.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 11, hvor koblingsforbindelsen omfatter tris-(brommetyl)benzen (TBMB).

20 13. Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvor tris-(brommetyl)benzen er til stede ved 10 µM.

25 14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor chelateringsmidlet er etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), acetonitrilet er til stede ved 20 % og inkuberingstrinnet (iii) utføres i 1 time.

30 15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 14, der nevnte fremgangsmåte omfatter det ytterligere trinnet (iv) som kløyver en eller flere bindinger i polypeptidkjeden.

16. Fremgangsmåte ifølge krav 15, hvor nevnte kløyvningstrinn omfatter å la nevnte polypeptid komme i kontakt med en protease.

35 17. Kompleks skaffet tilveie ved fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 16.

18. Fremgangsmåte for å identifisere et kompleks ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, som er i stand til å binde til en ligand, dr fremgangsmåten omfatter

- 5 (i) å tilveiebringe et kompleks ifølge et hvilket som helst av de foregående krav  
(ii) å sette nevnte kompleks i kontakt med en ligand og  
(iii) å selektere de kompleksene som binder nevnte ligand.

19. Fremgangsmåte ifølge krav 18, som ytterligere omfatter å bestemme nukleinsyresekvensen til nevnte kompleks.

10

20. Fremgangsmåte ifølge krav 18, som ytterligere omfatter trinnet med å produsere det isolerte komplekset som kan binde til nevnte ligand.

21. Fremgangsmåte ifølge krav 18, som ytterligere omfatter trinnet med å produsere et polypeptid-koblingsforbindelsekonjugat, isolert eller identifisert ved hjelp av en fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse, der nevnte produksjon omfatter å feste koblingsforbindelsen til polypeptidet hvor nevnte polypeptid uttrykkes rekombinant eller blir kjemisk syntetisert.

15

22. Fremgangsmåte ifølge krav 21, som ytterligere omfatter trinnet med å utvide polypeptidet ved en eller flere av de N-terminale eller C-terminale endene på polypeptidet.

20

23. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 21 eller 22, som ytterligere omfatter trinnet med å konjugere nevnte polypeptid-koblingsforbindelsekonjugat til ytterligere et polypeptid.

25

24. Fremgangsmåte ifølge krav 23, hvor nevnte konjugering utføres ved  
(i) å tilsette et ytterligere cystein til polypeptidet etter binding til koblingsforbindelsen og  
(ii) å konjugere nevnte polypeptid til nevnte ytterligere polypeptid via disulfidbinding til nevnte ytterligere cystein.

30

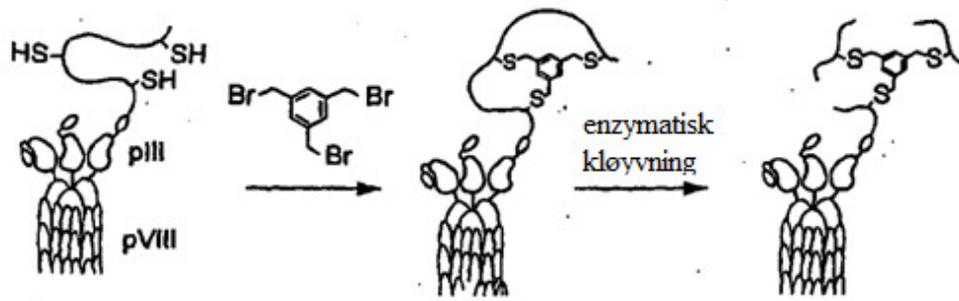


Fig. 1

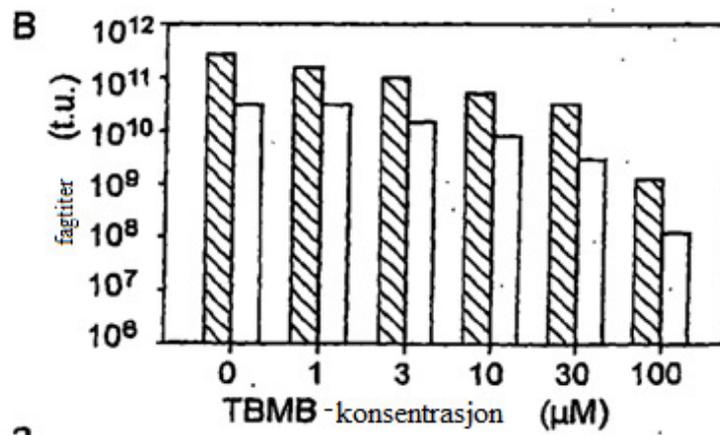
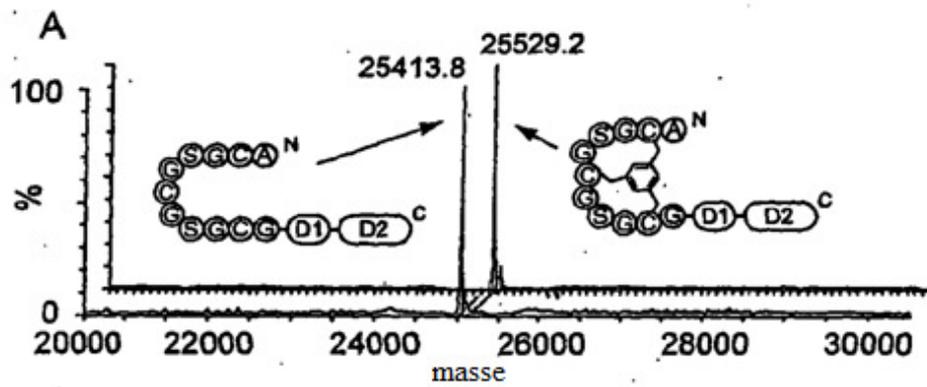
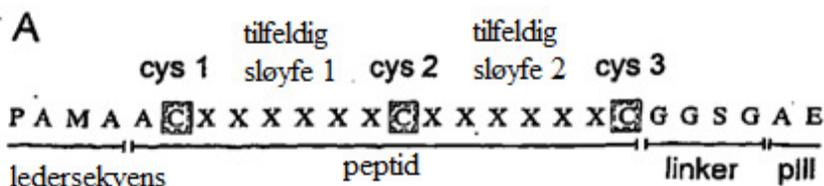


Fig. 2.

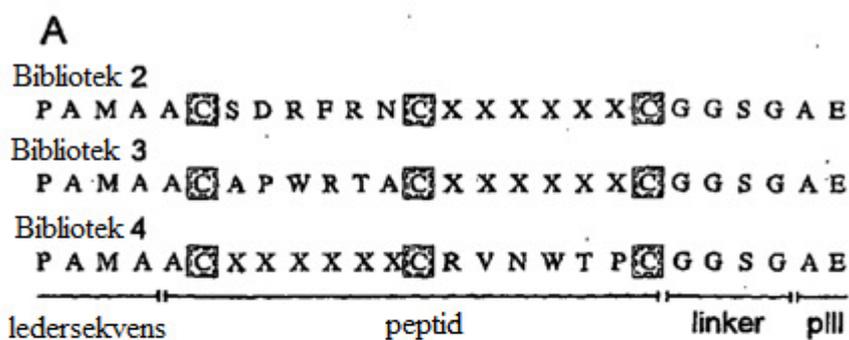
**B**

Mutant:	Aminosyresekvens:	IC <sub>50</sub> (nM):
PK1	A [C] D S R F R N C N W S M S G [C] G	1500
PK2	A [C] S D R F R N C N L W S G T [C] G	400
PK3	A [C] R D I R F R C N Y D V A V [C] G	
PK4	A [C] S T E R R Y [C] P I E I F P [C] G	400
PK5	A [C] A W R T M [C] L N I D G P [C] G	
PK6	A [C] A W R T A C Y E D L M W [C] G	500
PK7	A [C] V W R T L C M E S E G V [C] G	
PK8	A [C] F L W R T C V H E P T M [C] G	
PK9	A [C] W Q V Q V N [C] R V N P G K [C] G	800
PK10	A [C] G G N S D R [C] R V N N I S [C] G	2000
PK11	A [C] G R G D Q T [C] R V N W H [C] G	
PK12	A [C] - - V H N Y [C] R V N W V T [C] G	1800
PK13	A [C] G T G E G R [C] R V N W T [C] G	500

**C**

Mutant:	Aminosyresekvens:	IC <sub>50</sub> (nM):
CG1	A [C] E Y G D L W [C] G W D P P V [C] G	
CG2	A [C] E Y D V G F [C] W D G F G Q [C] G	100
CG3	A [C] L F D A G F [C] Q Q H S T E [C] G	
CG4	A [C] I F D L G F [C] H N D W W N [C] G	100
CG5	A [C] L F D L G F [C] G G G E G P [C] G	150
CG6	A [C] P R I E G F [C] L P I F S D [C] G	1000
CG7	A [C] L R A Q E D [C] V Y D R G F [C] G	200
CG8	A [C] T R G S G D [C] T Y D F G F [C] G	200

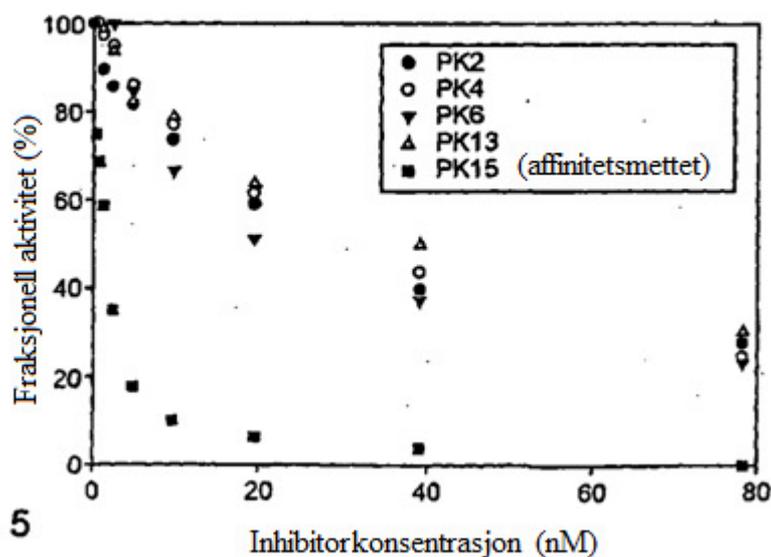
Fig. 3



**B**

Mutant:	Aminosyresekvens :	IC <sub>50</sub> (nM):
PK14	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P L A D E R E <b>C</b> G	.
PK15	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P A D B A L <b>C</b> G	20
PK16	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P V D E A L <b>C</b> G	20
PK17	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y D E W L <b>C</b> G	30
PK18	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P G D E S L <b>C</b> G	
PK19	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y T L H D <b>C</b> G	30
PK20	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y V S S D <b>C</b> G	
PK21	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y S E G D <b>C</b> G	
PK22	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P V W D S S <b>C</b> G	
PK23	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P V S E S A <b>C</b> G	50

Fig. 4



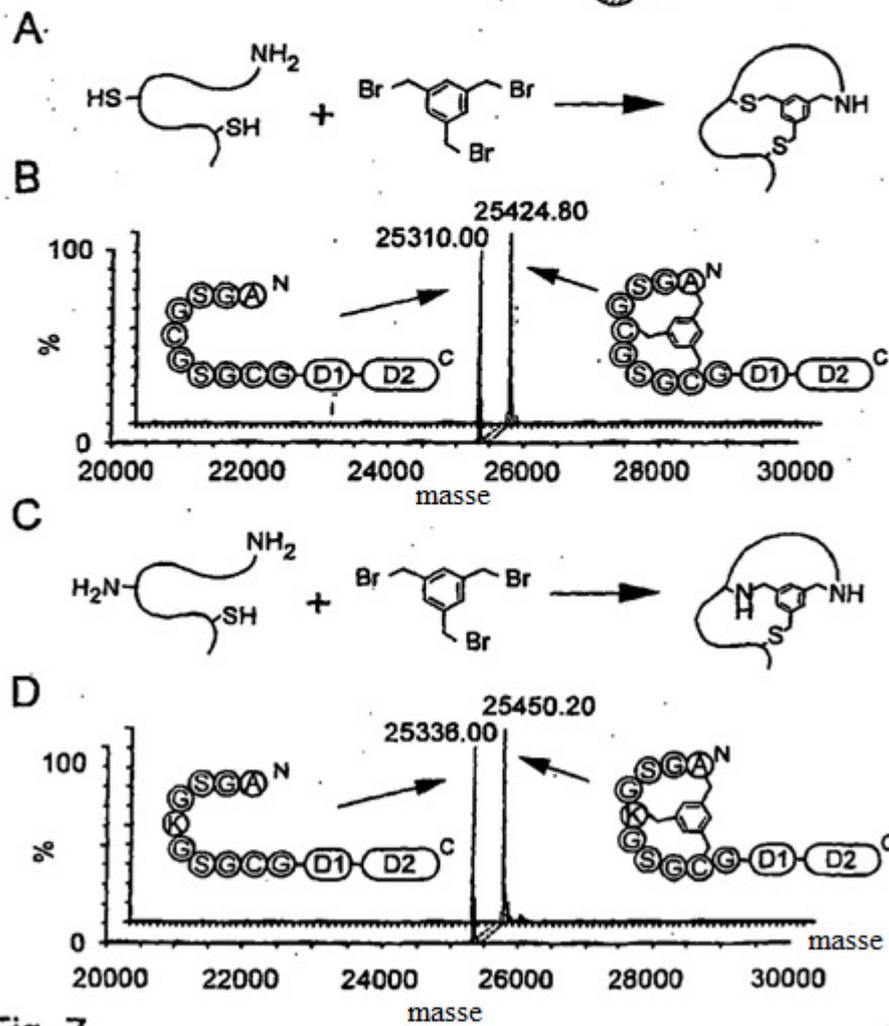
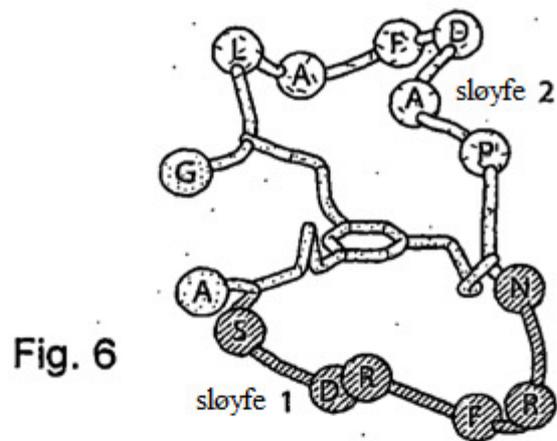


Fig. 7

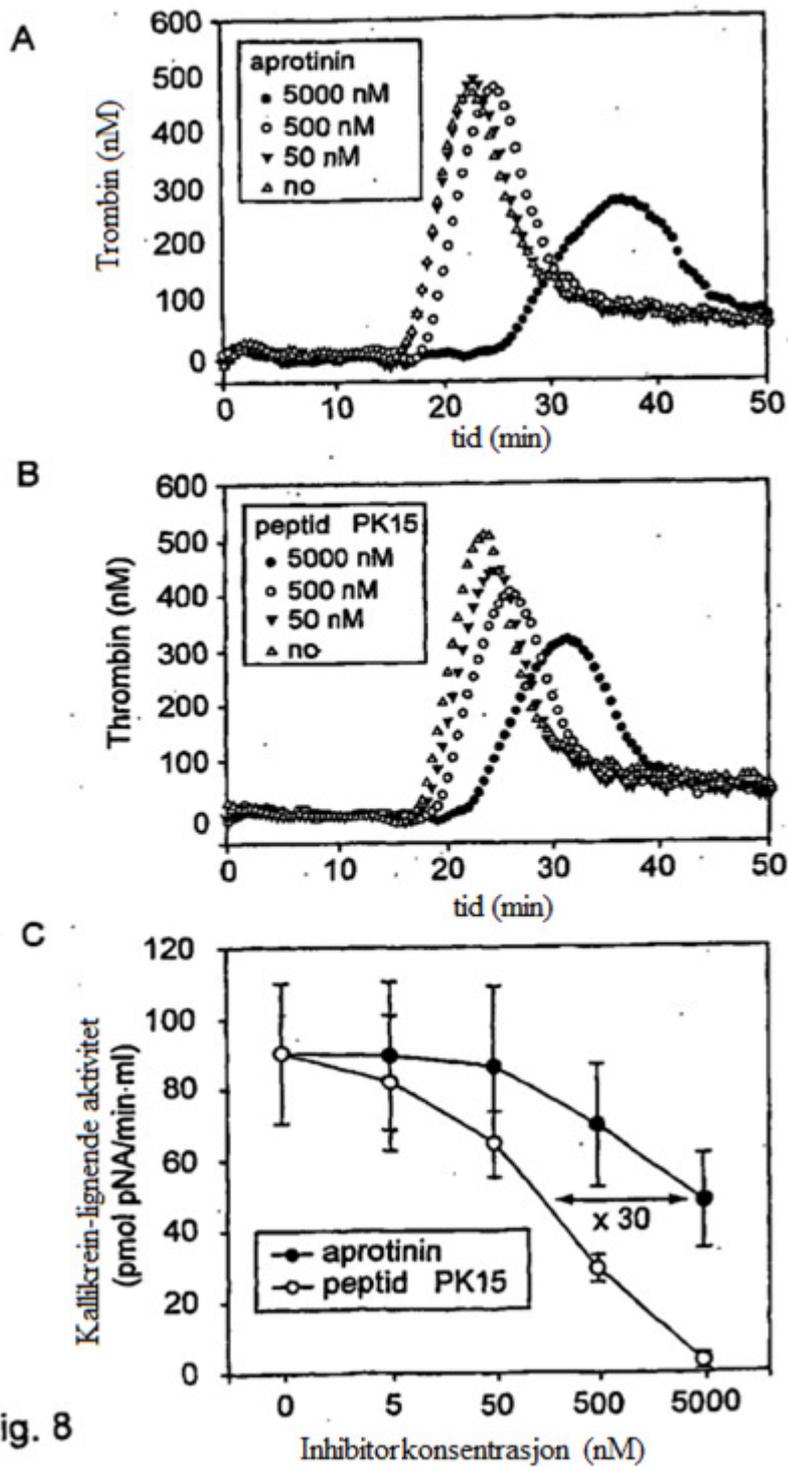


Fig. 8

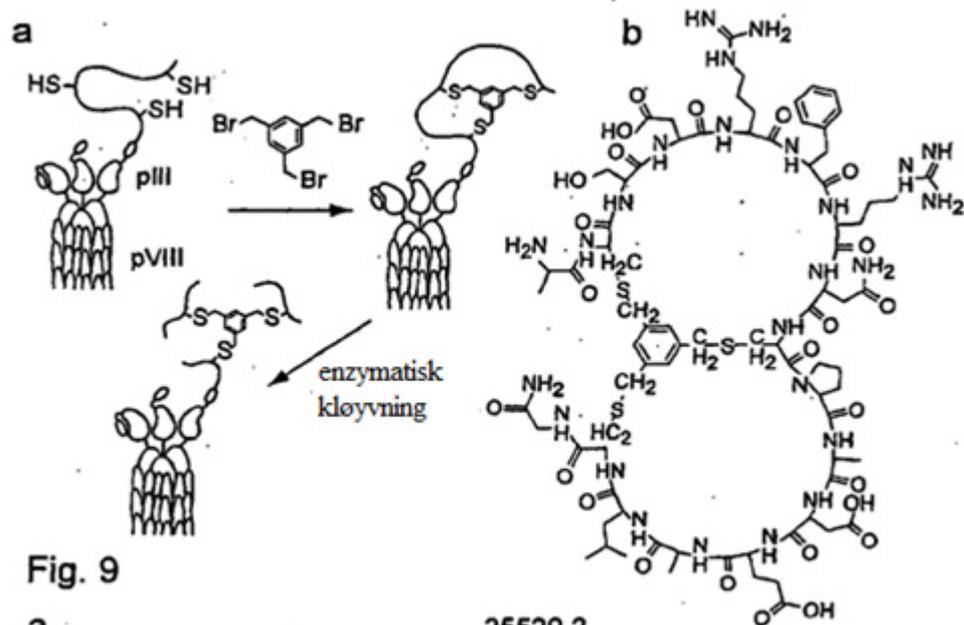


Fig. 9

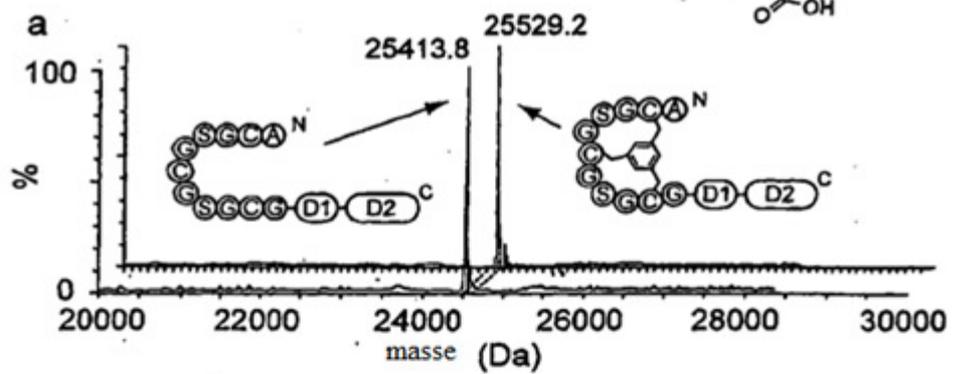


Fig. 10

TBMB-konsentrasjon (μM)

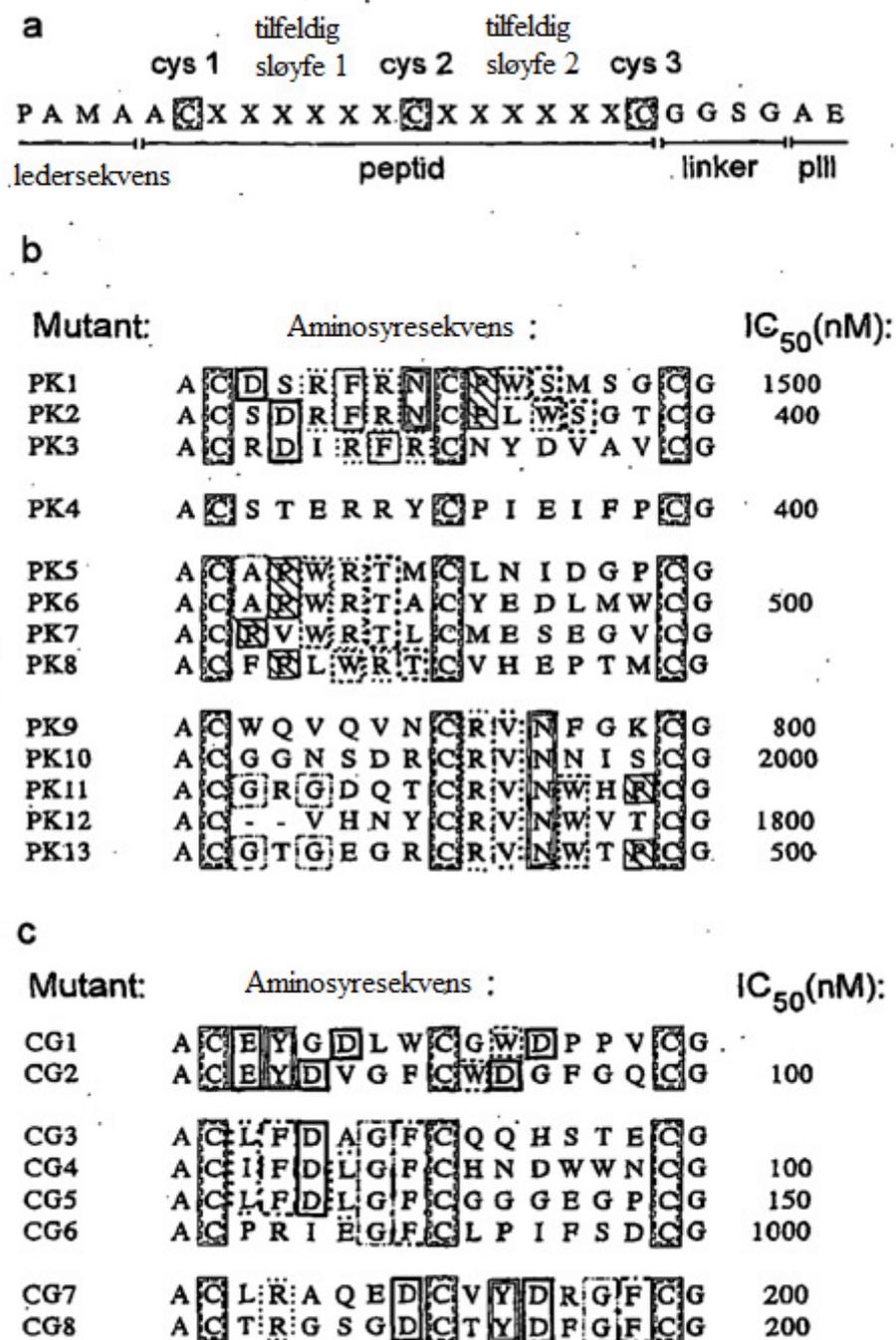


Fig. 11

**a**

Bibliotek 2

P A M A A **C** S D R F R N **C** X X X X X X **C** G G S G A E

Bibliotek 3

P A M A A **C** A P W R T A **C** X X X X X X **C** G G S G A E

Bibliotek 4

P A M A A **C** X X X X X X **C** R V N W T P **C** G G S G A E

ledersekvens

peptid

linker

pIII

**b**

Mutant:	Aminosyresekvens:	IC <sub>50</sub> (nM):
PK14	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P A D E R E <b>C</b> G	
PK15	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P A D E A L <b>C</b> G	20
PK16	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P V D E A L <b>C</b> G	20
PK17	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y D E W L <b>C</b> G	30
PK18	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P G D E S L <b>C</b> G	
PK19	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y T L H D <b>C</b> G	30
PK20	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y V S S D <b>C</b> G	
PK21	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> P Y S E G D <b>C</b> G	
PK22	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> R V W D S S <b>C</b> G	
PK23	A <b>C</b> S D R F R N <b>C</b> R V S E S A <b>C</b> G	50

Fig. 12

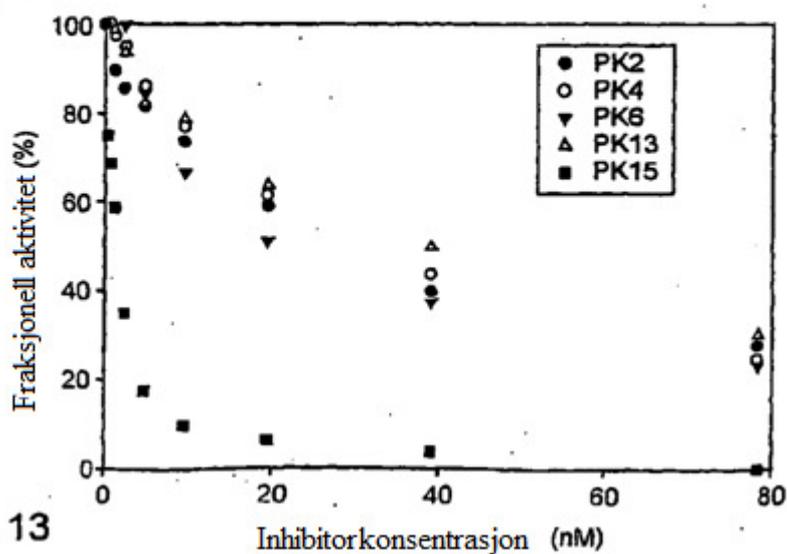


Fig. 13

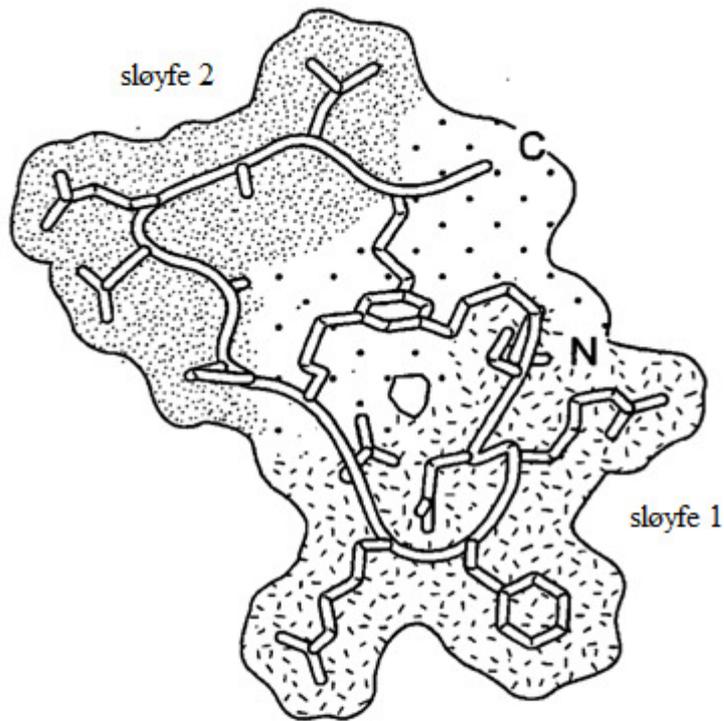


Fig. 14

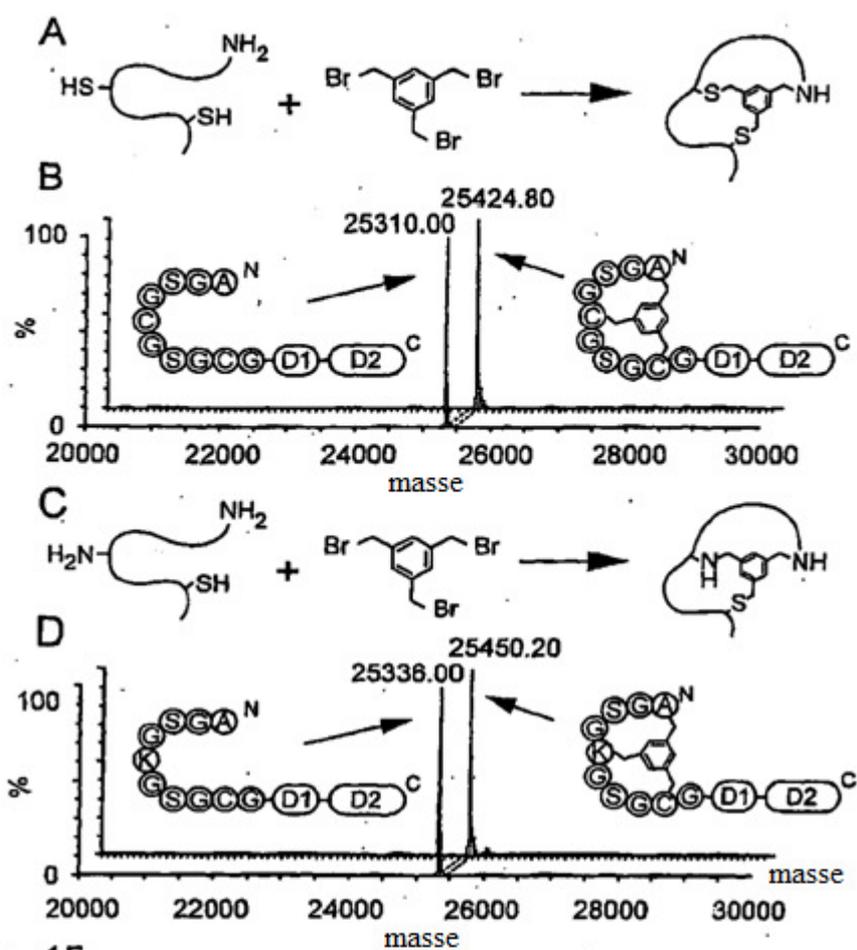


Fig. 15

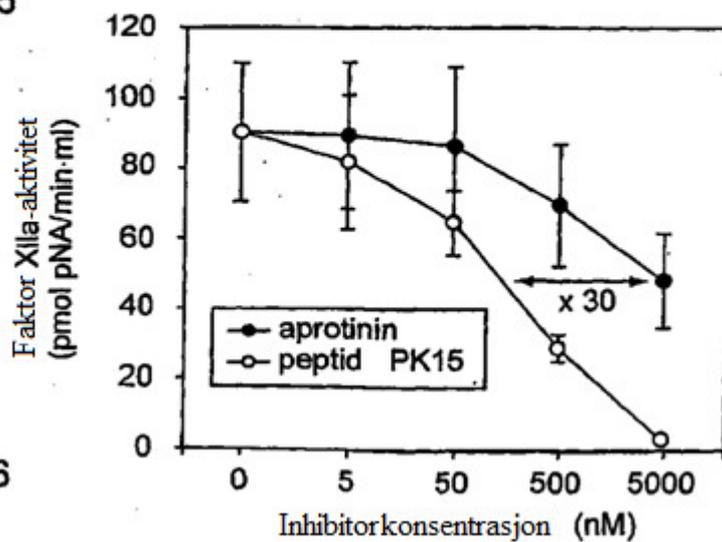


Fig. 16