



(12) Translation of  
European patent specification

(11) NO/EP 3532612 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

**C12N 15/10 (2006.01)**

**C12N 15/62 (2006.01)**

**C07K 16/12 (2006.01)**

**G01N 33/68 (2006.01)**

**Norwegian Industrial Property Office**

---

|      |                                                                            |                                                                                                                                                           |
|------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (45) | Translation Published                                                      | 2022.09.26                                                                                                                                                |
| (80) | Date of The European<br>Patent Office Publication of<br>the Granted Patent | 2022.06.29                                                                                                                                                |
| (86) | European Application Nr.                                                   | 17797583.6                                                                                                                                                |
| (86) | European Filing Date                                                       | 2017.10.30                                                                                                                                                |
| (87) | The European Application's<br>Publication Date                             | 2019.09.04                                                                                                                                                |
| (30) | Priority                                                                   | 2016.10.31, EP, 16196571                                                                                                                                  |
| (84) | Designated Contracting<br>States:                                          | AL; AT; BE; BG; CH; CY; CZ; DE; DK; EE; ES; FI; FR; GB; GR; HR; HU; IE; IS; IT;<br>LI; LT; LU; LV; MC; MK; MT; NL; NO; PL; PT; RO; RS; SE; SI; SK; SM; TR |
| (73) | Proprietor                                                                 | Universität Zürich, Prorektorat VNW Rämistrasse 71, 8006 Zürich, Sveits                                                                                   |
| (72) | Inventor                                                                   | SEEGER, Markus, 8800 Thalwil, Sveits<br>EGLOFF, Pascal, Glärnischstr. 5, 8800 Thalwil, Sveits<br>ZIMMERMANN, Iwan, Giblenstr. 27, 8049 Zürich, Sveits     |
| (74) | Agent or Attorney                                                          | ONSAGERS AS, Postboks 1813, Vika, 0123 OSLO, Norge                                                                                                        |

---

(54) Title                    **COLLECTION OF TAGS AND METHODS FOR PROTEIN DETECTION, PREFERABLY BY  
MASS SPECTROMETRY**

(56) References  
Cited: WO-A1-2014/139130  
WO-A1-00/31115  
WO-A1-00/57183  
EP-A2- 1 647 600  
WO-A1-2009/036157  
EP-A1- 2 436 766  
WO-A1-97/07132  
WO-A2-2007/134327  
WO-A2-2004/011676  
KIMPLE MICHELLE E ET AL: "Overview of affinity tags for protein purification.", CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE 24 SEP 2013, vol. 73, 24 September 2013 (2013-09-24), page Unit 9.9, XP002777664, ISSN: 1934-3663  
I. Zimmermann et al.: "Synthetic single domain antibodies for the conformational trapping of membrane proteins", , 26 July 2017 (2017-07-26), 26 July 2017 (2017-07-26), pages 1-60, XP002777665, DOI: 10.1101/168559 Retrieved from the Internet:  
URL:https://www.biorxiv.org/content/early/ 2017/07/26/168559 [retrieved on 2018-01-24]  
HERNAN RON ET AL: "Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection", BIOTECHNIQUES RAPID DISPATCHES, INFORMA HEALTHCARE, US, vol. 28, no. 4, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 789-793, XP002158419, ISSN: 0736-6205

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

## PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å velge et polypeptid fra et bibliotek av polypeptider, som omfatter trinnene med å
  - 5 a. tilveiebringe et første nukleinsyre-bibliotek, der hvert medlem i nevnte første nukleinsyre-bibliotek omfatter en polypeptidkodende sekvens som koder for et medlem av et første polypeptid-bibliotek,
  - b. tilveiebringe et andre nukleinsyre-bibliotek, der nevnte andre nukleinsyre-bibliotek omfatter et flertall av medlemmer, der hvert medlem omfatter  
10 en merke-kodende sekvens som koder for et deteksjonsmerke, der nevnte deteksjonsmerke:
    - i. er karakterisert ved en aminosyresekvens som er forskjellig fra aminosyresekvensen til ethvert annet deteksjonsmerke som er kodet for med nevnte andre nukleinsyre-bibliotek,
    - 15 ii. er karakterisert ved en molekylmasse på mellom 200 og 5000 Da, spesielt mellom 500 og 2500 Da, mer foretrukket mellom omtrent 900 og 2200 Da, og
    - iii. omfatter et første fraskillebart element,
    - iv. er karakterisert ved en hydrofobisitetsverdi på mellom -27 og  
20 128 som beregnet med fremgangsmåten som er beskrevet her,
  - c. sette nevnte polypeptidkodende sekvens som er omfattet i nevnte medlem av nevnte første nukleinsyre-bibliotek inn i et medlem av nevnte andre nukleinsyre-bibliotek, for derved å danne et merket nukleinsyre-bibliotek som koder  
25 for et merket polypeptid-bibliotek, der hvert medlem av nevnte merkede polypeptid-bibliotek omfatter et polypeptid og et deteksjonsmerke separert fra nevnte polypeptid med nevnte første fraskillebare element,
  - d. oppnå et flertall av nukleinsyresekvenser fra nevnte merkede nukleinsyre-bibliotek, der hvert av nevnte flertall av nukleinsyresekvenser omfatter  
30 en polypeptidkodende sekvens og en merke-kodende sekvens,

- e. predikere et massespektrometri-fragmenteringsmønster for hvert deteksjonsmerke som er kodet for av en merke-kodende sekvens som er oppnådd i trinn d,
- 5 f. uttrykke nevnte merkede polypeptid-bibliotek fra nevnte merkede nukleinsyre-bibliotek,
- g. velge et medlem av nevnte merkede polypeptid-bibliotek i et seleksjonstrinn, som gir et valgt polypeptid,
- 10 h. fraskille nevnte første fraskillebare element, for derved å separere nevnte deteksjonsmerke fra nevnte valgte polypeptid, for å gi et isolert deteksjonsmerke,
- i. identifisere nevnte isolerte deteksjonsmerke ved å
- 15 i. registrere et fragmenteringsmønster for nevnte isolerte deteksjonsmerke med massespektrometri,
- ii. matche nevnte fragmenteringsmønster som er oppnådd i trinn i. med nevnte fragmenteringsmønstre som er predikert i trinn e., for derved å identifisere nevnte isolerte deteksjonsmerke,
- j. velge fra nevnte flertall av nukleinsyresekvenser som er oppnådd i trinn d. en nukleinsyresekvens som omfatter en merke-kodende sekvens som koder
- 20 for nevnte deteksjonsmerke som er identifisert i trinn i., for derved å identifisere medlemmet av nevnte merkede polypeptid-bibliotek som er assosiert med nevnte deteksjonsmerke som er identifisert i trinn i.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
- 25 der nevnte isolerte deteksjonsmerke er karakterisert ved en hydrofobisitetsverdi på mellom -1 og 70.
3. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene ovenfor,

der nevnte isolerte deteksjonsmerke omfatter et sekvenselement I som er valgt fra en samling av sekvenselementer I, der nevnte sekvenselement I består av 5 til 10, spesielt 7 aminosyrer, som uavhengig av hverandre er valgt fra A, S, T, N, Q, D, E, V, L, I, F, Y, W, G og P.

5

4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene ovenfor,

der nevnte isolerte deteksjonsmerke består av

- a. et sekvenselement III, der nevnte sekvenselement III er GS,
- b. nevnte sekvenselement I, der nevnte sekvenselement I består av 5 til 10, spesielt 7 aminosyrer, som uavhengig av hverandre er valgt fra A, S, T, N, Q, D, E, V, L, I, F, Y, W, G og P, og
- c. nevnte sekvenselement II som er valgt fra SEQ ID nr. 01 (WR), SEQ ID nr. 02 (WLR), SEQ ID nr. 03 (WQSR), SEQ ID nr. 04 (WLTVR) og SEQ ID nr. 05 (WQEGGR),

15 der spesielt rekkefølgen av nevnte sekvenselementer fra N-terminal til C-terminal er sekvenselement III, sekvenselement I, sekvenselement II.

5. Samling av polypeptider,

der hvert medlem av nevnte samling av polypeptider er assosiert med et  
20 deteksjonsmerke, spesielt minst ett, mer spesifikt minst to, enda mer spesifikt minst fem, enda mer spesifikt minst 10, enda mer spesifikt omtrent tjue deteksjonsmerker, og der nevnte deteksjonsmerke

- a. er karakterisert ved en aminosyresekvens som er forskjellig fra aminosyresekvensen til ethvert annet deteksjonsmerke av polypeptidene,
- 25 b. er karakterisert ved en molekylmasse på mellom 200 og 5000 Da, spesielt mellom 500 og 2500 Da, mer foretrukket mellom omtrent 900 og 2200 Da,
- c. er separert fra nevnte medlem i nevnte samling av polypeptider med et første fraskillebart element,
- d. er karakterisert ved en hydrofobisitetsverdi på mellom -27 og 128, spesielt  
30 mellom -1 og 70, som beregnet med fremgangsmåten som er beskrevet her,

- e. består av 7 til 21 sammenhengende aminosyrer og omfatter kun én aminosyre som har en positivt ladd sidekjede som er lokalisert på C-terminalen av deteksjonsmerket og som er valgt fra arginin og lysin.
- 5      6.      Samling av polypeptider ifølge ethvert av kravene 5, der nevnte deteksjonsmerke omfatter
- 10      a. et sekvenselement I, der nevnte sekvenselement I består av 5 til 10, spesielt 7 aminosyrer, som uavhengig av hverandre er valgt fra A, S, T, N, Q, D, E, V, L, I, F, Y, W, G og P, og
- 10      b. et sekvenselement II som er valgt fra SEQ ID nr. 01 (WR), SEQ ID nr. 02 (WLR), SEQ ID nr. 03 (WQSR), SEQ ID nr. 04 (WLTVR) og SEQ ID nr. 05 (WQEGGR).
- 15      7.      Samling av deteksjonsmerker, som omfatter minst 96, mer spesifikt minst 500 000 deteksjonsmerker, enda mer spesifikt minst  $10^7$  deteksjonsmerker, enda mer spesifikt omtrent  $10^8$  deteksjonsmerker, der hvert deteksjonsmerke:
- 20      a. består av 7 til 18, mer spesifikt 11 til 15 aminosyrer, og
- 20      b. er karakterisert ved en aminosyresekvens som er forskjellig fra aminosyresekvensen ifølge ethvert annet deteksjonsmerke som er omfattet i nevnte samling av deteksjonsmerker,
- 25      c. omfatter kun én aminosyre som har en positivt ladd sidekjede som er lokalisert på C-terminalen til deteksjonsmerket og er valgt fra arginin og lysin,
- 25      d. er karakterisert ved en molekylmasse på mellom 200 og 5000 Da, spesielt mellom 500 og 2500 Da, mer spesifikt mellom 900 og 2200 Da,
- 25      e. er karakterisert ved en hydrofobisitetsverdi mellom -27 og 128, som beregnet med fremgangsmåten som er beskrevet her.
- 30      8.      Samling av deteksjonsmerker ifølge krav 7, der hvert deteksjonsmerke i alt vesentlig består av

- a. et sekvenselement I, der nevnte sekvenselement I består av 5 til 10, spesielt 7 aminosyrer, som uavhengig av hverandre er valgt fra A, S, T, N, Q, D, E, V, L, I, F, Y, W, G og P, og
- b. et sekvenselement II som er valgt fra SEQ ID nr. 01 (WR), SEQ ID nr. 02 (WLR), SEQ ID nr. 03 (WQSR), SEQ ID nr. 04 (WLTVR) og SEQ ID nr. 05 (WQEGGR).

9. Samling av plasmidvektorer, spesielt minst 96, mer foretrukket minst 500 000, enda mer foretrukket minst  $10^7$  plasmidvektorer, enda mer foretrukket omtrent  $10^8$  plasmidvektorer, der hvert medlem av nevnte samling av plasmidvektorer omfatter en merke-kodende nukleinsyresekvens som koder for et deteksjonsmerke, der hvert deteksjonsmerke består av 4 til 20, spesielt 7 til 18, mer foretrukket 11 til 15 aminosyrer og er karakterisert ved en aminosyresekvens som er forskjellig fra aminosyresekvensen til ethvert annet deteksjonsmerke som er kodet for av nevnte samling av plasmidvektorer, og der nevnte kodede deteksjonsmerke er karakterisert ved en hydrofobisitetverdi mellom -27 og 128 som beregnet med fremgangsmåten som er beskrevet her, og består av 7 til 18 aminosyrer og omfatter kun én aminosyre som har en positivt ladd sidekjede som er lokalisert på C-terminalen til deteksjonsmerket og er valgt fra arginin og lysin.

10. Samling av plasmidvektorer ifølge krav 9, der nevnte deteksjonsmerke i alt vesentlig består av
- a. et sekvenselement I, der nevnte sekvenselement I består av 5 til 10, spesielt 7 aminosyrer, som uavhengig av hverandre er valgt fra A, S, T, N, Q, D, E, V, L, I, F, Y, W, G og P, og
- b. et sekvenselement II som er valgt fra SEQ ID nr. 01 (WR), SEQ ID nr. 02 (WLR), SEQ ID nr. 03 (WQSR), SEQ ID nr. 04 (WLTVR) og SEQ ID nr. 05 (WQEGGR).

## 11. Fremgangsmåte for proteindeteksjon,

som omfatter

- a. tilveiebringe et nukleinsyre-bibliotek som koder for et polypeptid-bibliotek  
der nevnte polypeptid-bibliotek omfatter et flertall av medlemmer og hvert  
5 medlem er assosiert med et deteksjonsmerke, og der nevnte deteksjonsmerke
  - i. er karakterisert ved en aminosyresekvens som er forskjellig fra  
aminosyresekvensen til ethvert annet deteksjonsmerke som er  
kodet for av nevnte nukleinsyre-bibliotek,
  - ii. er karakterisert ved en molekylmasse på mellom 200 og 5000 Da,  
10 spesielt mellom 500 og 2500 Da, mer spesifikt mellom omtrent  
900 og 2200 Da, og
  - iii. er separert fra nevnte medlem av nevnte samling av polypeptider  
med et første fraskillebart element,
  - iv. er karakterisert ved en hydrofobisitetverdi mellom -27 og 128,  
15 som beregnet med fremgangsmåten som er beskrevet her,
- b. tilveiebringe en database som omfatter
  - i. et flertall av nukleinsyre- og/eller aminosyresekvenser, der  
nevnte flertall av sekvenser omfatter sekvensene til alle  
medlemmer av nevnte nukleinsyre-bibliotek, og der hver av  
20 sekvensene omfatter en sekvens som spesifiserer et polypeptid  
og en sekvens som spesifiserer et deteksjonsmerke,
  - ii. et predikert massespektrometri-fragmenteringsmønster for  
hvert deteksjonsmerke som er kodet for av nevnte nukleinsyre-  
bibliotek,
- c. uttrykke nevnte polypeptidbibliotek fra nevnte nukleinsyre-bibliotek,
- d. velge et medlem av nevnte polypeptid-bibliotek i et seleksjonstrinn, som gir et  
valgt polypeptid,
- e. fraskille nevnte første fraskillebare element, for derved å separere nevnte  
deteksjonsmerke fra nevnte valgte polypeptid, for å gi et isolert  
30 deteksjonsmerke,
- f. identifisere nevnte isolerte deteksjonsmerke ved å
  - i. registrere et fragmenteringsmønster for nevnte isolerte  
deteksjonsmerke med massespektrometri,



- ii. matche nevnte fragmenteringsmønster som er oppnådd i trinn i. med nevnte fragmenteringsmønstre som er predikert i nevnte database, for derved å identifisere nevnte isolerte deteksjonsmerke,
- 5        g. velge fra nevnte flertall av sekvenser som er omfattet i nevnte database en sekvens som spesifiserer nevnte deteksjonsmerke som er identifisert i trinn f., for derved å identifisere medlemmet av nevnte polypeptid-bibliotek som er assosiert med nevnte deteksjonsmerke som er identifisert i trinn f.
  
- 10      12.    Fremgangsmåte ifølge krav 11,
- der hvert medlem av nevnte polypeptid-bibliotek eller der hvert deteksjonsmerke er assosiert med et affinitetsmerke, spesielt et affinitetsmerke som er valgt fra gruppen som omfatter et His-merke, et CBP-merke, et CYD-merke, et Strep-merke, et StrepII-merke, et FLAG-merke, et HPC-merke, et GST-merke, et Avi-merke, et
- 15      biotinyleringsmerke, et Myc-merke, et 3xFLAG-merke og et MBP-merke, og/eller, der nevnte affinitetsmerke fortrinnsvis er separert fra nevnte deteksjonsmerke med et andre fraskillebart element, og nevnte andre fraskillebare element blir fraskilt før trinn f.
  
- 20
- 13.    Fremgangsmåte for å assosiere et polypeptid med et unikt deteksjonsmerke, som omfatter trinnene med å
  - a. tilveiebringe et første nukleinsyre-bibliotek, der hvert medlem i nevnte første nukleinsyre-bibliotek omfatter en polypeptidkodende sekvens som
  - 25        koder for et medlem av et første polypeptid-bibliotek,
  - b. tilveiebringe et andre nukleinsyre-bibliotek, der hvert medlem av nevnte andre nukleinsyre-bibliotek omfatter en merke-kodende sekvens som koder for et deteksjonsmerke, der nevnte deteksjonsmerke:

- i. er karakterisert ved en aminosyresekvens som er forskjellig fra aminosyresekvensen til ethvert annet deteksjonsmerke som er kodet for av nevnte andre nukleinsyre-bibliotek,
    - ii. er karakterisert ved en molekylmasse på mellom 200 og 5000 Da, spesielt mellom 500 og 2500 Da, mer spesifikt mellom omtrent 900 og 2200 Da,
    - iii. er karakterisert ved en hydrofobisitetsverdi på mellom -27 og 128, som beregnet med fremgangsmåten som er beskrevet her,
    - iv. omfatter et første fraskillebart element,
  - c. sette nevnte polypeptidkodende sekvens som er omfattet i nevnte medlem av nevnte første nukleinsyre-bibliotek inn i et medlem av nevnte andre nukleinsyre-bibliotek, der
    - i. nevnte første nukleinsyre-bibliotek har en størrelse på 5 til 100 000, spesielt 100 til 50 000, mer spesifikt 500 til 5000, og
    - ii. nevnte andre nukleinsyre-bibliotek har en størrelse på  $10^3$  til  $10^{11}$ , spesielt  $10^5$  til  $10^{10}$ , mer spesifikt  $10^6$  til  $10^9$ , ende mer spesifikt omtrent  $10^8$ , for derved å generere et flertall av polypeptid/merke-kombinasjonsplasmider,
  - d. velge en undergruppe av nevnte flertall av polypeptid/merke-kombinasjonsplasmider, for derved å generere et merket nukleinsyre-bibliotek som koder for et merket polypeptid-bibliotek.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,
- der, i trinn d., den valgte undergruppen av flertallet av polypeptid-merke-kombinasjonsplasmider er minst 3x, spesielt minst 5x, minst 10x, minst 15x, minst 20x eller minst 25, antallet medlemmer i det første nukleinsyre-biblioteket.