

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 580**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2010 E 10704902 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2393520**

54 Título: **Procesamiento de péptidos estructurados**

30 Prioridad:

**04.02.2009 WO PCT/GB2009/000301**

**06.08.2009 GB 0913775**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.11.2015**

73 Titular/es:

**BICYCLE THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)  
Meditrina, Babraham Research Campus  
Cambridge CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**WINTER, GREGORY PAUL;  
HEINIS, CHRISTIAN;  
BERNARD, ELISE;  
LOAKES, DAVID y  
VAYSBURD, MARINA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 551 580 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

### Procesamiento de péptidos estructurados

La invención se refiere al procesamiento de péptidos cuya estructura está constreñida por la unión a un compuesto que proporciona un núcleo estructural, impartiendo una conformación al péptido. En particular, la invención se refiere al tratamiento proteolítico de dichos péptidos, bien para seleccionar péptidos resistentes a proteasa o para seleccionar productos de escisión generados.

### Introducción

La generación de moléculas con alta afinidad y especificidad para dianas biológicas es un problema central en química, biología y las ciencias farmacéuticas. En particular, los ligandos de unión son importantes para la creación de fármacos que puedan intervenir con procesos biológicos. La creación de ligandos que se unen a un ligando diana elegido implica habitualmente un proceso de generación de una pluralidad de moléculas de unión posibles y el ensayo de dichas molécula para sus propiedades de unión.

Los polipéptidos ligados a una estructura molecular sintética se conocen en la técnica (Kemp D.S. y McNamara, P.E., J. Org. Chem, 1985; Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005). Meloen y colaboradores han usado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para una ciclación rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos en andamios sintéticos para un mimetismo estructural de superficies proteicas (Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005). Los métodos para la generación de compuestos candidatos a fármaco en los que dichos compuestos se generan por la unión de polipéptidos que contienen cisteína a un andamio molecular como por ejemplo tris(bromometil)benceno se describen en WO 2004/077062 y WO 2006/078161.

WO 2004/077062 describe un método para seleccionar un compuesto candidato a fármaco. En particular, este documento describe varias moléculas andamio que comprenden un primer y segundo grupos reactivos, y poner en contacto dicho andamio con una molécula adicional para formar al menos dos uniones entre el andamio y la molécula adicional en una reacción de acoplamiento.

WO 2006/078161 describe compuestos de unión, compuestos inmunogénicos y peptidomiméticos. Este documento describe la síntesis artificial de varias colecciones de péptidos tomados de proteínas existentes. Estos péptidos se combinan con un péptido sintético constante que tiene algunos cambios en los aminoácidos introducidos con el fin de producir bibliotecas combinatorias. Mediante la introducción de esta diversidad mediante la unión química a péptidos separados que presentan varios cambios en los aminoácidos, se proporciona una oportunidad incrementada de encontrar la actividad de unión deseada. La Figura 7 de este documento muestra una representación esquemática de la síntesis de varias construcciones peptídicas en bucle. Sin embargo, los péptidos producidos tienen especificidades únicas. Cuando se proporcionan múltiples bucles peptídicos, los bucles cooperan para unirse a una única diana.

En nuestra solicitud de patente internacional en tramitación con la presente WO2009098450 describimos el uso de tecnología de selección biológica, tal como exposición en fago, para seleccionar péptidos ligados a estructuras moleculares sintéticas.

El uso de tratamiento proteolítico para modificar polipéptidos, incluyendo repertorios de polipéptidos, se conoce en la técnica. Por ejemplo, GB2428293 (Domantis Limited) describe un método para reducir la valencia de péptidos presentados en fago mediante tratamiento del fago con proteasa, de manera que la mayoría de los fagos no presentan péptidos, y una proporción son monovalentes.

Las estrategias para seleccionar proteínas plegadas establemente de repertorios de proteínas presentadas en fagos tomando como base su resistencia a degradación proteolítica se han usado para mejorar la estabilidad de proteínas naturales. La degradación proteolítica está restringida habitualmente a proteínas no plegadas o regiones altamente flexibles de proteínas plegadas. Las proteínas plegadas son muy resistentes a proteasas, porque la escisión proteolítica requiere que la cadena polipeptídica se adapte a la estereoquímica específica del sitio activo de la proteasa, y, por lo tanto, que sea flexible, accesible y capaz de desplegamiento local.

Además, las proteasas se han usado en la técnica para la generación de productos de escisión deseados, por ejemplo en la producción de fragmentos de anticuerpo Fc. Fab y Fv.

Hemos encontrado que las técnicas de digestión con proteasa pueden adaptarse para modificar polipéptidos estructurados ligados a andamios moleculares sintéticos, ya estén presentados en fago o no. Estas técnicas permiten la producción no sólo de péptidos estructurados resistentes a proteasa, sino también de productos de escisión de proteasa en los que una pluralidad de polipéptidos permanecen ligados a un andamio.

### Resumen de la invención

En una primera realización, se proporciona un método para preparar uno o más ligandos peptídicos como se muestra en las reivindicaciones 1 y 2.

Los sistemas aplicables incluyen presentación en fago, presentación en bacterias, presentación en levadura, presentación en ribosoma o polisoma, presentación en ARNm y expresión in vitro en microcápsulas artificiales. Un sistema de presentación en ARNm se describe en Litovchick et al., PNAS 7 de octubre, 2008 vol. 105 no. 40; 15293-15298. La técnica preferida es presentación en fago usando un bacteriófago filamentosos.

5 El ligando peptídico se selecciona para la capacidad de unirse a una o más dianas. Los ligandos pueden ser monoespecíficos, respecto a que se unen a una única diana, o multiespecíficos, que es capaz de unirse a dos o más dianas diferentes. Los ligandos multiespecíficos pueden estar en una conformación abierta, en la que pueden unirse a dos o más dianas diferentes simultáneamente, o en una conformación cerrada, en la que sólo pueden unirse a una diana cada vez.

10 Los ligandos peptídicos comprenden al menos un bucle polipeptídico, formado por la secuencia de aminoácidos delimitada ente los al menos dos grupos reactivos unidos al andamio molecular. Preferiblemente, los ligandos peptídicos comprenden dos o más bucles, y pueden comprender tres, cuatro o más bucles. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender 3 o más grupos reactivos, entre los cuales están delimitados dos o más bucles. Un polipéptido que comprende tres grupos reactivos soportará dos bucles en una forma lineal, o tres bucles si está circularizado.

15 Una aplicación particular del método de la invención es crear repertorios de ligandos peptídicos. Dichos repertorios pueden crearse, por ejemplo, presentando repertorios de polipéptidos en fago y posteriormente conjugándolos con andamios moleculares, como se describe en WO2009098450.

20 La proteólisis se usa para seleccionar aquellos conjugados que son resistentes al ataque proteolítico. Por lo tanto, la invención se refiere a la selección de ligandos peptídicos resistentes a proteasa. Dichos ligandos son útiles en entornos en los que están presentes proteasas, tales como en las superficies mucosales. La invención es particularmente útil con repertorios de conjugados, que pueden cribarse y seleccionarse según su resistencia a proteasa.

25 El repertorio puede no haber sido tratado en el momento del tratamiento proteolítico, y los miembros resistentes a la proteólisis seleccionados del repertorio pueden cribarse para unión a una o más dianas después del tratamiento proteolítico.

En dicha realización, el método comprende además preferiblemente: opcionalmente, tratar el repertorio con agente reductor; someter el repertorio a selección para resistencia a proteasa; cribar dicho repertorio para unión frente a una diana, y seleccionar los miembros del primer repertorio que se unen a la diana.

30 En otra realización, el repertorio puede cribarse para unión a una o más dianas antes del tratamiento proteolítico.

En dicha realización, el método comprende además las etapas de cribar dicho repertorio para unión frente a una diana, y seleccionar los miembros del primer repertorio que se unen a la diana antes del tratamiento con una proteasa; opcionalmente, tratar el repertorio seleccionado con un agente reductor; someter el repertorio a selección para resistencia a proteasa; y posteriormente cribar adicionalmente dicho repertorio para unión a la diana.

35 Preferiblemente, los ligandos peptídicos son capaces de unirse específicamente a una o más dianas.

Adecuadamente, los ligandos peptídicos son multiespecíficos.

Los conjugados se presentan ventajosamente en un sistema de presentación genético, tal como presentación en fago.

40 La escisión proteolítica puede usarse para seleccionar los ligandos que son resistentes a proteasa. Dichos ligandos son útiles en aplicaciones médicas, donde puede ser necesario operar en un entorno rico en proteasa. Por ejemplo, los ligandos peptídicos de la invención pueden actuar como ligandos para moléculas del sistema inmune, por ejemplo como antígenos. Pueden, por lo tanto, ser útiles como vacunas, adyuvantes y fármacos inmunoterapéuticos.

#### **Descripción breve de las figuras**

45 La Figura 1 muestra la unión de los clones de fago 10 y 48 (Ejemplo 1) a MDM2 como conjugados cíclicos o péptidos no conjugados, sin pre-tratamiento con DTT, y con pre-tratamiento con DTT, y con pre-tratamiento con DTT seguido de quimotripsina.

La Figura 2 muestra un gráfico de anisotropía de fluorescencia para los péptidos PEP10 y PEP48, indicando la afinidad para MDM2. Véase el Ejemplo 1.

#### **Descripción detallada de la invención**

50 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica, tal como en las técnicas de química de péptidos, cultivo celular y presentación en fago, química y bioquímica de ácidos nucleicos. Se usan técnicas

estándar para métodos de biología molecular, genética y bioquímica (véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc.), que se incorporan en la presente memoria por referencia.

5 Un ligando peptídico, tal como se refiere en la presente memoria, se refiere a un péptido unido covalentemente a un andamio molecular. Típicamente, dichos péptidos comprenden dos o más grupos reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes con el andamio, y una secuencia delimitada entre dichos grupos reactivos que se refiere como la secuencia bucle, ya que forma un bucle cuando el péptido se une al andamio.

10 Los grupos reactivos son grupos capaces de formar un enlace covalente con el andamio molecular. Típicamente, los grupos reactivos están presentes en cadenas laterales de aminoácidos en el péptido. Se prefieren los grupos que contienen amino tales como cisteína, lisina y selenocisteína.

15 La proteólisis es la escisión de un polipéptido por una enzima proteolítica, referida como una proteasa. Las proteasas adecuadas incluyen tripsina (escinde en Lys, Arg), quimotripsina (Phe, Trp, Tyr Leu), termolisina (residuos alifáticos pequeños), subtilisina (residuos alifáticos pequeños), Glu-C (Glu), Factor Xa (Ile/Leu-Glu-Gly Arg), Arg-C (Arg) y trombina. En una realización, como no se puede garantizar que la secuencia polipeptídica potencialmente aleatoria en los repertorios genere un sitio de escisión preciso para una proteasa particular, se usa una proteasa capaz de escindir en una variedad de sitios.

Cuando se requiere la escisión de una secuencia específica, puede usarse una proteasa más específica. Las proteasas específicas se describen adicionalmente más adelante.

20 La resistencia a proteasa se usa para indicar resistencia incrementada a escisión proteolítica. Por ejemplo, dicha resistencia puede conseguirse a través de la modificación de la secuencia primaria del péptido, o del núcleo polipeptídico. Por ejemplo, las alteraciones en la secuencia primaria pueden eliminar el sitio de escisión para la proteasa, siempre que las alteraciones no impliquen residuos que hacen contactos clave para la unión a la diana. Con los péptidos presentados en fago, las alteraciones se hacen lo más fácilmente con uno de los 20 residuos amino codificados por ácido nucleico. Con péptidos preparados por síntesis química, puede usarse un rango de otras cadenas laterales, por ejemplo cambiando lisina a ornitina o arginina a citrulina, o semejantes.

Preferiblemente, un péptido resistente a proteasa es 2, 3, 4, 5, 10, 20 veces o más, más resistente a escisión proteolítica que un péptido no modificado.

30 La multiespecificidad es la capacidad de unirse a dos o más dianas. Típicamente, los péptidos de unión son capaces de unirse a una única diana, tal como un epítipo en el caso de un anticuerpo, debido a sus propiedades conformacionales. Sin embargo, pueden desarrollarse péptidos que pueden unirse a dos o más dianas; anticuerpos específicos duales, por ejemplo, como se conoce en la técnica como se ha referido anteriormente. En la presente invención, los ligandos peptídicos son capaces de unirse a dos o más dianas y, por lo tanto, son multiespecíficos. Preferiblemente, se unen a dos dianas, y son específicos duales. La unión puede ser independiente, lo que significaría que los sitios de unión para las dianas en el péptido no están estructuralmente dificultados por la unión a una o la otra diana. En este caso, puede unirse a ambas dianas independientemente. Más generalmente, se espera que la unión a una diana impedirá al menos parcialmente la unión a la otra.

40 Los péptidos multiespecíficos pueden formarse uniendo entre sí bucles individuales de ligandos peptídicos que se unen a dianas individuales. Los bucles que se unen entre sí pueden ser bucles adyacentes, o pueden estar separados por un tercer bucle, o incluso bucles adicionales. Cuando los bucles se ponen directamente adyacentes en el péptido multiespecífico, se prefiere omitir uno de los grupos reactivos que define uno de los bucles, para evitar la duplicación efectiva de grupos reactivos en una posición.

45 Una diana es una molécula o parte de ésta a la que se unen los ligandos peptídicos. Típicamente, la diana será análoga a un epítipo, y así puede tener la forma de diferentes epítipos en la misma molécula, o diferentes epítipos en diferentes moléculas. Cuando las dianas están en la misma molécula, el uso de un ligando específico dual incrementará la avidéz del ligando para la molécula, y puede conferir otras propiedades debido al entrecruzamiento de la molécula o la ocupación de partes funcionales definidas de la molécula.

50 El andamio molecular es cualquier molécula que es capaz de conectar el péptido en múltiples puntos para conferir una o más características estructurales al péptido. No es un agente de entrecruzamiento, ya que no reemplaza meramente un enlace disulfuro; en lugar de esto, proporciona dos o más puntos de unión para el péptido. Preferiblemente, el andamio molecular comprende al menos tres puntos de unión para el péptido, referidos como grupos reactivos de andamio. Estos grupos son capaces de reaccionar con los grupos reactivos en el péptido para formar un enlace covalente. Las estructuras preferidas para andamios moleculares se describen más adelante.

55 Un repertorio es una colección de variantes, en este caso variantes polipeptídicas, que se diferencian en su secuencia. Típicamente, la localización y naturaleza de los grupos reactivos no variará, pero las secuencias que forman los bucles entre ellos pueden aleatorizarse. Los repertorios se diferencian en tamaño, pero deben considerarse para comprender al menos  $10^2$  miembros. Pueden construirse repertorios de  $10^{11}$  o más miembros.

El cribado para la actividad de unión (o cualquier otra actividad deseada) se realiza según los métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, a partir de tecnología de presentación en fago. Por ejemplo, pueden usarse dianas inmovilizadas en una fase sólida para identificar y aislar miembros de unión de un repertorio. El cribado permite la selección de miembros de un repertorio según características deseadas.

- 5 El término biblioteca se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta por miembros, cada uno de los cuales tiene una única secuencia de polipéptido o ácido nucleico. En este sentido, la biblioteca es sinónimo de repertorio. Las diferencias de secuencia entre miembros de una biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tener la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en la forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células animales o de plantas y semejantes, transformadas con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene sólo uno o un número limitado de miembros de la biblioteca.

- 10 Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una biblioteca puede tener la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su miembro polipeptídico correspondiente. Así, la población de organismos huésped tiene el potencial para codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.

- 15 Preferiblemente, una biblioteca de ácidos nucleicos codifica un repertorio de polipéptidos. Cada miembro ácido nucleico de la biblioteca tiene preferiblemente una secuencia relacionada con uno más miembros distintos de la biblioteca. Por secuencia relacionada se quiere decir una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50% de identidad, adecuadamente al menos 60% de identidad, adecuadamente al menos 70% de identidad, adecuadamente al menos 80% de identidad, adecuadamente al menos 90% de identidad, adecuadamente al menos 95% de identidad, adecuadamente al menos 98% de identidad, adecuadamente al menos 99% de identidad respecto al menos a otro miembro de la biblioteca. La identidad se juzga adecuadamente a lo largo de un segmento contiguo de al menos 3 aminoácidos, adecuadamente al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos, adecuadamente al menos 12 aminoácidos, adecuadamente al menos 14 aminoácidos, adecuadamente al menos 16 aminoácidos, adecuadamente al menos 17 aminoácidos o la longitud completa de la secuencia de referencia.

- 20 Un grupo funcional, unido a un ligando peptídico, es un grupo que, por ejemplo, media una actividad de unión adicional o permite la unión de un grupo efector. Así, los grupos funcionales incluyen anticuerpos y fragmentos de unión de éstos, ligandos peptídicos adicionales como se describe en la presente memoria, grupos químicos reactivos, y semejantes.

- 25 Un grupo efector es un grupo unido al ligando peptídico que tiene una actividad específica. Por ejemplo, puede ser una proteína que incrementa la vida media del ligando peptídico, tal como albúmina de suero humano (HSA). Los grupos efectores también incluyen fármacos, tales como fármacos citotóxicos, inmunoeffectores, tales como regiones Fc de anticuerpos, y compuestos que se atienen a los parámetros siguientes: no más de 5 donantes de enlace de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno con uno o más átomos de hidrógeno); no más de 10 aceptores de enlace de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno); un peso molecular por debajo de 500 daltons; y una coeficiente de reparto octanol-agua log P de menos de 5.

#### A. Ligandos peptídicos

- 30 El diseño y producción de ligandos peptídicos se describe en nuestra solicitud de patente Internacional publicada WO 2009/098450, así como las solicitudes de patente Internacional WO 2004/077062 y WO 2006/078161. Los aspectos siguientes resumen la construcción de ligandos peptídicos.

##### (i) Andamio molecular

- 35 El andamio molecular se refiere algunas veces como el "núcleo molecular" o "compuesto conector". Adecuadamente, el andamio molecular posee simetría molecular. Adecuadamente, el andamio molecular posee tres grupos reactivos de andamio y posee simetría triple. Esto tiene la ventaja de producir sólo un único producto de reacción. Si el andamio molecular no es una molécula simétrica, entonces pueden producirse múltiples productos de reacción. Esto puede dar lugar a complicaciones, o requerir la separación del isómero deseado de los demás productos de reacción.

- 40 Adecuadamente, el andamio molecular puede ser una molécula pequeña. Adecuadamente, el andamio molecular es una molécula orgánica pequeña.

Adecuadamente, el andamio molecular puede ser, o puede basarse en, monómeros naturales tales como nucleósidos, azúcares, o esteroides. Adecuadamente, el andamio molecular puede comprender un polímero corto de dichas entidades, tal como un dímero o un trímero.

- 45 Adecuadamente, el andamio molecular puede comprender o puede consistir en tris(bromometil)benceno, especialmente 1,3,5-Tris(bromometil)benceno ("TBMB"), o un derivado de éste.

Otro andamio molecular adecuado es 2,4,6-Tris(bromometil)mesitileno. Es similar a 1,3,5-Tris(bromometil)benceno pero contiene adicionalmente tres grupos metilos unidos al anillo benceno. Esto tiene la ventaja de que los grupos metilo adicionales pueden formar contactos adicionales con el polipéptido y, por lo tanto, añadir una restricción estructural adicional.

- 5 El andamio molecular de la presente invención se selecciona bien de una molécula pequeña o una estructura macromolecular. Dicho andamio molecular está compuesto por componentes orgánicos, inorgánicos u orgánicos e inorgánicos.

10 En una realización preferida, el andamio molecular es una molécula orgánica pequeña como por ejemplo un alcano lineal. Más adecuadamente, el andamio molecular es un alcano ramificado, un alcano cíclico, un alcano policíclico, un aromático, un alcano heterocíclico o un aromático heterocíclico, que ofrece la ventaja de ser menos flexible (es decir, más rígido). Lo más adecuadamente, el andamio molecular comprende un grupo bencílico.

En otra realización, el andamio molecular se selecciona de una estructura molecular como por ejemplo un polipéptido, un polinucleótido o un polisacárido.

15 El andamio molecular de la invención contiene grupos químicos que permiten a los grupos funcionales del polipéptido de la biblioteca codificada de la invención formar uniones covalentes con el andamio molecular. Dichos grupos químicos se seleccionan de un amplio rango de funcionalidades incluyendo aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, anhídridos, succinimidas, maleimidas, azidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

#### (ii) Polipéptido

20 Los grupos reactivos de los polipéptidos codificados se proporcionan adecuadamente por cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales. Los grupos reactivos de los polipéptidos codificados se seleccionan adecuadamente de grupos tiol, grupos amino, grupos carboxilo, grupos guanidinio, grupos fenólicos o grupos hidroxilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos codificados pueden seleccionarse adecuadamente de grupos azida, ceto-carbonilo, alquino, vinilo, o haluro de arilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos codificados para unirse a un andamio molecular pueden ser adecuadamente el extremo amino o carboxi del polipéptido.

25 En algunas realizaciones, cada uno de los grupos reactivos del polipéptido para unirse a un andamio molecular son del mismo tipo. Por ejemplo, cada grupo reactivo puede ser un residuo de cisteína.

30 Los aminoácidos adecuados de los miembros de las bibliotecas químicas combinatorias genéticamente codificadas pueden reemplazarse por cualquier aminoácido natural o no natural. Se excluyen de estos aminoácidos intercambiables los que presentan grupos funcionales para entrecruzamiento de los polipéptidos a un núcleo molecular. Un grupo de aminoácidos adyacentes que puede variarse se define como un segmento polipeptídico. El tamaño de un único segmento polipeptídico varía adecuadamente de 1 a 20 aminoácidos. Los segmentos polipeptídicos tienen bien secuencias aleatorias, secuencias constantes o secuencias con aminoácidos aleatorios y constantes. Los aminoácidos con grupos reactivos están localizados bien en posiciones definidas o aleatorias en el polipéptido codificado de la invención.

35 En una realización, los segmentos polipeptídicos que están unidos por dos aminoácidos que presentan grupos reactivos para unión con un andamio molecular/núcleo molecular son secuencias cortas de aminoácidos de 10 o menos aminoácidos. La reacción de dichas secuencias polipeptídicas codificadas con un núcleo molecular genera miembros de biblioteca con alta restricción conformacional. Los ligandos con restricción conformacional son generalmente más específicos y tienen mayores afinidades de unión.

#### (iii) Grupos reactivos del polipéptido

45 El andamio molecular de la invención puede estar unido al polipéptido a través de grupos funcionales o reactivos en el polipéptido. Éstos se forman típicamente a partir de las cadenas laterales de aminoácidos particulares encontrados en el polímero polipeptídico. Dichos grupos reactivos pueden ser una cadena lateral de cisteína, una cadena lateral de lisina, o un grupo amino N-terminal o cualquier otro grupo reactivo adecuado.

50 Adecuadamente, al menos un grupo reactivo es un grupo cisteína. Los grupos tales como lisina o las aminas N-terminales típicamente no son los suficientemente reactivos como para unirse con el andamio molecular por sí mismos en un marco de tiempo conveniente. Sin embargo, una vez el andamio molecular ha sido atraído o unido al menos a una cisteína, entonces la cinética de reacción habitual significa que los enlaces lisina o amina pueden formarse rápidamente y establemente a partir de ahí. Por esta razón, adecuadamente al menos uno de los grupos reactivos es un grupo cisteína.

Si se desean grupos reactivos en el polipéptido distintos de los grupos cisteína/lisina/amina, entonces puede elegirse un andamio molecular diferente con el fin de emparejar con los grupos reactivos funcionales particulares elegidos en el polipéptido diana.

Adecuadamente, se usan grupos cisteína, lisina o amina como los grupos funcionales o reactivos en el polipéptido de interés.

Adecuadamente, se forman al menos tres enlaces covalentes entre el andamio molecular y el polipéptido de interés.

5 En algunas realizaciones, pueden formarse cuatro enlaces o incluso más entre el andamio molecular y el polipéptido de interés. Sin embargo, si se usan más de cuatro enlaces, entonces típicamente las mezclas de productos formadas se vuelven cada vez más complejas y pueden dificultar los usos o aplicaciones posteriores. Por esta razón, se prefieren tres enlaces o cuatro enlaces entre el andamio molecular y el polipéptido de interés.

10 Los grupos reactivos adecuados de aminoácidos naturales son el grupo tiol de la cisteína, el grupo amino de la lisina, el grupo carboxilo del aspartato o glutamato, el grupo guanidinio de la arginina, el grupo fenólico de la tirosina o el grupo hidroxilo de la serina. Los aminoácidos no naturales pueden proporcionar un amplio rango de grupos reactivos incluyendo un grupo azida, un ceto-carbonilo, un alquino, un vinilo, o un haluro de arilo. El grupo amino y carboxilo del extremo del polipéptido también puede servir como grupos reactivos para formar enlaces covalentes con un andamio molecular/núcleo molecular.

15 Los polipéptidos codificados de la invención contienen adecuadamente al menos tres grupos reactivos. Dichos polipéptidos también pueden contener cuatro o más grupos reactivos. Cuantos más grupos reactivos se usen, más diversidad de segmentos pueden ligarse al andamio molecular/núcleo molecular. Sin embargo, la unión de números excesivos de grupos reactivos a un andamio molecular/núcleo molecular no se recomienda ya que esto puede dar lugar a un número inmanejable de isómeros del producto. Adecuadamente, se usan tres, cuatro o cinco enlaces covalentes a un andamio molecular; lo más adecuadamente, tres o cuatro enlaces covalentes; lo más  
20 adecuadamente, tres enlaces covalentes.

#### **B: Unión de andamios a péptidos de fago**

Las condiciones detalladas para la unión de andamios a péptidos de fago sin destruir la infectividad del fago se describen en nuestra solicitud de patente internacional WO 2009/098450. La unión de moléculas de andamio implica los principios siguientes.

25 En particular, se requiere la reducción de las cisteínas en el polipéptido diana para la reacción más eficiente. Posteriormente, el agente reductor usado para reducir químicamente estas cisteínas se elimina habitualmente con el fin de llevar a cabo la unión deseada. Los grupos tiol de un polipéptido codificado por un fago pueden reducirse con agente reductor antes de la unión al andamio molecular. En dichas realizaciones, en particular en realizaciones de presentación en fago, o en particular cuando el agente reductor es TCEP, el exceso de agente reductor se elimina  
30 adecuadamente por filtración, por ejemplo, filtración del fago. Sin embargo, en algunas realizaciones, el agente reductor puede estar presente durante la unión a niveles que no reaccionan con el andamio molecular suficientemente como para comprometer la reacción del andamio molecular con las cisteínas del péptido.

La re-oxidación de los grupos tiol puede evitarse incluyendo TCEP en la reacción del péptido con el andamio molecular.

35 La re-oxidación de los grupos tiol se evita adecuadamente desgaseando el tampón de reacción.

La re-oxidación de los grupos tiol también se evita adecuadamente mediante la formación de un complejo de iones metálicos por quelación, por ejemplo, quelación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Lo más adecuadamente, la re-oxidación de los grupos tiol se evita o inhibe incluyendo TCEP en la reacción del andamio molecular, por quelación y por el uso de tampones desgaseados.

40 En una realización de la presente invención, la unión del polipéptido al andamio molecular se consigue haciendo reaccionar los grupos reactivos del polipéptido tal como los grupos tiol de un polipéptido codificado por fago con el andamio molecular durante una hora.

Adecuadamente, se hacen reaccionar a 30°C.

45 Adecuadamente, se hacen reaccionar con el andamio molecular (tal como tris(bromometil)benceno) a una concentración de 10 µM a 40µM.

Adecuadamente, la reacción es en tampón acuoso.

Adecuadamente, la reacción es a pH 8.

Adecuadamente, el tampón de reacción contiene acetonitrilo. Adecuadamente, el tampón de reacción contiene 20% acetonitrilo.

50 Estas condiciones de reacción se optimizan para hacer reaccionar cuantitativamente los grupos tiol de un polipéptido con los grupos reactivos de tris(bromometil)benceno. En las mismas condiciones de reacción, aproximadamente el

20% de las partículas de fago permanecen infectivas para llevar el código genético a las células bacterianas para propagación y descodificación.

5 En una realización, el andamio molecular, tal como TBMB, puede unirse al polipéptido diana, tal como un polipéptido codificado por fago, por reacción (incubación) de los grupos tiol del polipéptido durante una hora a 30°C con 10  $\mu\text{M}$  TBMB (es decir, tris(bromometil)benceno) en presencia de 10  $\mu\text{M}$  TCEP en tampón acuoso pH 8 que contiene 20% acetronitrilo. En otra realización, la reacción puede llevarse a cabo usando 40  $\mu\text{M}$  TBMB en presencia de 30  $\mu\text{M}$  TCEP en el mismo tampón.

### C: Escisión proteolítica

#### *Resistencia a proteasa*

10 En general, las estructuras polipeptídicas firmemente plegadas son más resistentes a proteasas, ya que la proteasa no puede acceder físicamente al polipéptido para escindirlo. Por lo tanto, la manipulación del andamio y unión del andamio en el ligando peptídico puede modular la sensibilidad a proteasa, influyendo en el plegamiento del bucle polipeptídico.

15 Una etapa de proteasa puede introducirse para escindir sitios accesibles en los bucles unidos a un andamio químico. Si un repertorio de conjugados peptídicos se presenta en un fago, esto da lugar a péptidos cada uno unido al andamio químico por al menos un enlace covalente, pero retenidos en un complejo que comprende el ácido nucleico que codifica el polipéptido parental. Se espera que el tratamiento del fago modificado químicamente con proteasa antes de la selección con antígeno de lugar a conjugados peptídicos que presentan fago con bucle(s) escindido(s), y también a conjugados peptídicos que presentan fago con bucle(s) no escindido(s) debido a la ausencia de un sitio de escisión, o que de otra manera son resistentes a la escisión. Es posible distinguir estas especies si una se une a un antígeno y la otra no, comparando la unión de los clones de fago seleccionados a antígeno diana antes y después del tratamiento con proteasa. Así, se esperará que las especies con bucles escindidos se unan después del tratamiento con proteasa, pero no antes; mientras se esperará que las especies resistentes a proteasa se unan tanto antes como después del tratamiento. Obsérvese que si un conjugado se une tanto con bucles escindidos como no escindidos (como con PK15 después de escisión con calicreína; véase Heinis et al, 2009), puede identificarse incorrectamente como resistente a proteasa. Esto muestra la importancia de usar un método directo para evaluar la escisión, por ejemplo, sintetizando los conjugados peptídicos químicamente, y evaluando la evidencia de escisión, por ejemplo, por espectrometría de masas.

20 Los péptidos resistentes a proteasa pueden ser útiles para administración oral para sobrevivir a las proteasas intestinales, u otras sometidas de otra manera a ataque proteolítico en la sangre, tejidos o células. Los terapéuticos resistentes a proteasa pueden administrarse además a dosis menores. En este caso, una primera ronda de selección sin proteasa, seguido de una ronda posterior de selección con proteasa, debería favorecer la selección de las especies resistentes.

30 El uso de proteasa tiene una utilidad adicional durante el proceso de selección. Por ejemplo, algunos bucles sin formar (segmentos lineales de secuencia) pueden estar presentes en las bibliotecas debido a (a) errores en la síntesis de los nucleótidos han fallado para codificar un residuo de cisteína requerido, o (b) un residuo de cisteína requerido ha formado un enlace disulfuro con cisteína libre en disolución (quizá debido a reducción inadecuada o reoxidación), o ha reaccionado de una manera irreversible (por ejemplo, se oxida a ácido cisteico, o una de las cisteínas requeridas ha reaccionado con una molécula diferente del andamio de las otras). Como los segmentos lineales de la secuencia son más susceptibles al ataque por proteasa que los bucles, siempre que esté presente un sitio de escisión, puede ser posible evitar dichos agentes de unión usando proteasa.

35 Una etapa de proteasa (en presencia de agente reductor) también es ventajosa para eliminar bucles que se han formado a través de disulfuros entre las cisteínas requeridas en lugar de a través del andamio químico. Esto puede esperarse si hay una reducción inadecuada (o reoxidación posterior) de las cisteínas en los fagos. Por esta razón, usamos tampones desgaseados durante la etapa de entrecruzamiento químico; también mantuvimos niveles bajos del agente reductor (TCEP) durante la reacción con TBMB para mantener el entorno reductor. No obstante, después de la primera ronda de selección, encontramos muchas secuencias que incluían cuatro residuos de cisteína (los tres residuos de cisteína requeridos, y un residuo de cisteína adicional en el bucle), por ejemplo PEP21 (CFNSEWSCLQSCSNC). Se espera que dichas cisteínas extra estén presentes en los repertorios de péptidos, ya que la biblioteca de nucleótidos sintéticos incluye codones aleatorios (diversidad NNK: donde N representa una mezcla del 25% de cada uno de los nucleótidos adenina, timina, guanina y citosina, y K representa una mezcla del 50% de cada uno de los nucleótidos timina y guanina). En algunas condiciones, por ejemplo si hay una reducción inadecuada, o reacción incompleta de las cisteínas requeridas con el andamio químico (quizá debido a reacciones de competición para el andamio por grupos amino o agua), puede esperarse que una cisteína extra, en condiciones oxidantes, forme bucles disulfuro con una de las tres cisteínas requeridas. Alternativamente, una cisteína extra puede reaccionar con el andamio, dejando que dos de las cisteínas requeridas formen bucles cerrados disulfuro.

55 Sea cual sea el mecanismo exacto que está detrás de su generación, dichos bucles cerrados disulfuro pueden competir con los bucles cerrados del andamio, y predominar. Debe ser posible reducir la frecuencia de las cisteínas extra usando bibliotecas de nucleótidos sintéticos construidas a partir de tripletes, en lugar de monómeros, evitando

así los codones de cisteína en los bucles; y/o realizar las selecciones en presencia de agente reductor, de manera que se abren los bucles cerrados disulfuro. Más convenientemente, hemos encontrado que el tratamiento de los repertorios de fago modificados químicamente con proteasa en presencia de agente reductor (tal como ditioneitol o TCEP), de manera que se abren y esciden los bucles, ayuda a minimizar la contribución de dichas especies.

5 Por lo tanto, los ligandos peptídicos de la invención son sustancialmente resistentes a proteasa. La exposición de los ligandos peptídicos a escisión después de selección frente a la diana favorecerá la identificación de ligandos peptídicos de unión que son resistentes a escisión por proteasa. Sin embargo, no puede excluirse que determinados ligandos peptídicos retendrán la capacidad de unirse a la diana después de la escisión.

10 Un cribado para resistencia a proteasa puede tener la forma simplemente de digestión limitada con una proteasa para identificar aquellos miembros del repertorio en los que la unión es sensible a proteasas, o requiere la acción de proteasas. Lo más deseable será el uso de una proteasa que sea activa en condiciones en las que se usará el péptido bicíclico, por ejemplo en presencia de suero.

*Condiciones para la escisión por proteasa*

15 El sitio de escisión puede ser un sitio de escisión enzimática tal como el escindido por una proteasa tal como trombina, Factor Xa, una enteropeptidasa tal como serina proteasa, enteroquinasa (incluyendo las descritas en WO 01/98366), o por ejemplo por tripsina, o puede ser un sitio de escisión química escindible por químicos tal como CNBr que escinde en un residuo de metionina.

Preferiblemente, se usan agentes de escisión enzimática. Es importante equilibrar la escisión del péptido en el ligando con la escisión del fago, que destruirá la infectividad del fago.

20 Existen varias proteasas altamente específicas. Aunque la invención no reside en la elección de ninguna proteasa particular, la proteasa es preferiblemente suficientemente específica en las condiciones usadas de manera que en dichas condiciones de escisión, tiene la capacidad de escindir el sitio de escisión en el ligando peptídico pero no cualquier polipéptido esencial para la viabilidad del fago. La selección de condiciones de escisión particulares, por ejemplo, baja temperatura, hace factible el uso de una proteasa que de otra forma sería inadecuada.

25 El sistema de coagulación de la sangre y del complemento contiene varias proteasas muy específicas. Habitualmente, las enzimas en las etapas tempranas de la cascada son más específicas de lo que lo son en las últimas. Por ejemplo, el Factor X, (FX) es más específico que la trombina. La FX bovina escinde después de Ile-Glu-Gly-Arg mientras FX humana escinde después de Ile-Asp-Gly-Arg. Puede usarse cualquier pareja de proteasa-conector, según se desee.

30 Si se usa la trombina, se encuentran sitios sensibles a trombina en fibrinógeno, Factor XIII, y protrombina. La especie de la que deriva FX influirá en la especificidad precisa de la proteasa, que está adaptada para escindir las secuencias precisas encontradas en sus dianas naturales in vivo.

35 El Factor XI humano escinde el Factor IX humano en dos sitios: QTSKLTR/AEAVF y SFNDFTR/VVGGE. Dicha proteasa proporciona, por lo tanto, un sistema de escisión muy específico, que escindirá péptidos sólo en un número muy limitado de sitios.

La calicreína humana corta FXII humano en R353: LFSSMTR/VGFLV.

Esta secuencia tiene una similitud significativa con los sitios hFXI anteriores.

El FXII humano corta FXI humano en R369: KIPPR/IVGGT.

40 Otras proteasas que se han usado para escindir proteínas de fusión incluyen enteroquinasa, tripsina, collagenasa, quimosina, uroquinasa, renina, y determinados péptidos señal. Véase Rutter, US 4.769.326 que se incorpora en la presente memoria por referencia.

En una realización preferida de la invención, la proteasa es una cualquiera en el grupo seleccionado de las siguientes: PreScission™ que reconoce y escinde el sitio de escisión LEVLFQGP; factor Xa que escinde el sitio IEGRGI; y trombina que escinde el sitio LVPRGS y el sitio LVPKGS.

45 Los expertos en la técnica apreciarán que las condiciones de escisión deben controlarse cuidadosamente de manera que el fago no se inactiva por la escisión de polipéptidos del fago esenciales. Como se ha indicado anteriormente, un rango completo de proteasas que son adecuadas para modificar polipéptidos expuestos pero que no afectan al fago se describen en Kristensen, P. y Winter, G. (Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages; Fold Des. 1998; 3(5): 321-8).

50 **D: Dianas**

Los ligandos peptídicos según la presente invención pueden diseñarse para unirse a cualquier diana dada. Un experto en la técnica apreciará que la elección de molécula diana es amplia y variada. Pueden ser, por ejemplo,

proteínas humanas o animales, citoquinas, receptores de citoquinas, co-factores de enzimas para enzimas o proteínas de unión a ADN. Las citoquinas y factores de crecimiento adecuados incluyen, pero no están limitados a: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10, ligando FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- I, insulina, IFNy, IGF-I, IGF-II, IL-1a, IL-1 (3, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-17a, IL-17c, IL-17d, IL-17e, IL-17f, IL-18 (IGIF), IL-21, IL-22, IL-23, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, Inhibina  $\alpha$ , Inhibina  $\beta$ , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora Mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos, M-CSF, MDC (67 a. a.), MDC (69 a. a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a. a.), MDC (69 a. a.), MIG, MIP-1a, MIP-1p, MIP-3a, MIP3, MIP-4, factor inhibidor del progenitor mieloides-1 (MPlF-1), NAP-2, Neurturina, Factor de crecimiento nervioso, P-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1a, SDF1p, SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TGF-2, TGF-3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor de VEGF 1, receptor de VEGF 2, receptor de VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , HCC1,1-309, HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4; los receptores de citoquinas incluyen receptores para las citoquinas anteriores. Las dianas quimoquinas incluyen ligandos de quimoquina CC CCL21/6Cquina, CCL12/MCP-5, CCL6/C10, CCL22/MDC, CCL14/HCC-1/HCC-3, CCL3L1/MIP-1 isoforma alfa LD78 beta, CCL23/Ck beta 8-1, CCL3/MIP-1 alfa, CCL28, CCL4L1/LAG-1, CCL27/CTACK, CCL4/MIP-1 beta, CCL24/Eotaxina-2/MPlF-2, CCL15/MIP-1 delta, semejante a CCL26/semejante a Eotaxina-3, CCL9/10/MIP-1 gamma, CCL26/Eotaxina-3, CCL19/MIP-3 beta, CCL11/Eotaxina, CCL20/MIP-3 alfa, CCL14a/HCC-1, CCL23/MPlF-1, CCL14b/HCC-3, CCL18/PARC, CCL16/HCC-4, CCL5/RANTES, CCL1/I-309/TCA-3, TAFAl/FAM19A1, MCK-2, TAFAl5/FAM19A5, CCL2/JE/MCP-1, TAFAl3/FAM19A3, CCL8/MCP-2, TAFAl4/FAM19A4, CCL7/MCP-3/MARC, CCL17/TARC, CCL13/MCP-4 y CCL25/TECK; los receptores de quimoquinas incluyen CCR1, CCR7, CCR2, CCR8, CCR3, CCR9, CCR4, CCR10, CCR5, CCRL2/LCCR/CRAM-A/B y CCR6; los ligandos quimoquina CXC incluyen CXCL13/BLC/BCA-1, CXCL10/IP-10/CRG-2, CXCL14/BRAK, LIX, CXCL16, CXCL15/Lungquina, CXCL5/ENA-78, CXCL9/MIG, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL1/2/3/GRO, CXCL4/PF4, CXCL1/GRO alfa/KC/CINC-1, CXCL12/SDF-1 alfa, CXCL2/GRO beta/MIP-2/CINC-3, CXCL12/SDF-1 beta, CXCL3/GRO gamma/CINC-2/DCIP-1, CXCL12/SDF-1, CXCL11/I-TAC, CXCL7/Quimoquina de Timo-1 y CXCL8/IL-8; los receptores de quimoquinas CXC incluyen CXCR3, CXCR7/RDC-1, CXCR4, CXCR1/IL-8 RA, CXCR5, CXCR2/IL-8 RB y CXCR6; los ligandos de la superfamilia de TNF incluyen ligando 4-1 BB/TNFSF9, LIGHT/TNFSF14, APRIL/TNFSF13, Linfotoxina, BAFF/BLYS/TNFSF13B, Linfotoxina beta/TNFSF3, ligando CD27/TNFSF7, ligando OX40/TNFSF4, ligando CD30/TNFSF8, TL1A/TNFSF15, ligando CD40/TNFSF5, TNF-alfa/TNFSF1A, EDA (general), TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A1/Ectodisplasina A1, TRAIL/TNFSF10, EDA-A2, TRANCE/TNFSF11, ligando Fas/TNFSF6, TWEAK/TNFSF12 y ligando GITR/TNFSF18; los receptores de la superfamilia TNF incluyen 4-1BB/TNFRSF9/CD137, NGF R/TNFRSF16, BAFF R/TNFRSF13C, Osteoprotegerina/TNFRSF11B, BCMA/TNFRSF17, OX40/TNFRSF4, CD27/TNFRSF7, RANK/TNFRSF11A, CD30/TNFRSF8, RELT/TNFRSF19L, CD40/TNFRSF5, TACI/TNFRSF13B, DcR3/TNFRSF6B, TNFRH3/TNFRSF26, DcTRAIL R1/TNFRSF23, TNF RI/TNFRSF1A, DcTRAIL R2/TNFRSF22, TNF RII/TNFRSF1B, DR3/TNFRSF25, TRAIL R1/TNFRSF10A, DR6/TNFRSF21, TRAIL R2/TNFRSF10B, EDAR, TRAIL R3/TNFRSF10C, Fas/TNFRSF6/CD95, TRAIL R4/TNFRSF10D, GITR/TNFRSF18, TROY/TNFRSF19, HVEM/TNFRSF14, TWEAK R/TNFRSF12, Linfotoxina beta R/TNFRSF3 y XEDAR; receptores Semejantes a Toll incluyendo TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9; enzimas, incluyendo Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina F, MMP 1, MMP2, MMP 3, MMP 7, MMP 8, MMP 9, MMP 10, MMP 11, MMP 12, MMP 13, MMP 14, MMP 15, MMP 16, MMP 17, MMP 19, MMP 20, MMP 21, MMP 23A, MMP 23B, MMP 26, MMP 27, MMP 28, uroquinasa, calicreínas, incluyendo KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14 y KLK15; componentes del sistema del complemento; moléculas de señalización intracelular y factores de transcripción; p53; y MDM2.

Se apreciará que esta lista no es de ninguna manera exhaustiva.

Las dianas también pueden ser proteínas plasmáticas mayores, tales como albúminas de suero, como se muestra más adelante.

50 Cuando el conjugado polipeptídico se une a dos epítopos (en la misma diana o dianas diferentes), las moléculas diana pueden seleccionarse de esta lista. Las dianas pueden competir para la unión al conjugado polipeptídico, de manera que no pueden unirse simultáneamente. Alternativamente, pueden unirse ambas simultáneamente, de manera que el conjugado polipeptídico forma un puente con las dianas.

Los ligandos resistentes a proteasa pueden seleccionarse para uso en dianas de unión tales como proteasas, o para uso en entornos ricos en proteasa, tal como en plasma o superficies mucosales.

Dichos ligandos son útiles en aplicaciones médicas, tales como vacunas, agentes terapéuticos y de diagnóstico.

### Ejemplos

La invención se describe adicionalmente con referencia a los ejemplos siguientes.

**Ejemplo 1. Péptidos bicíclicos resistentes a proteasa frente a MDM2**

MDM2 es una enzima (una ubiquitina ligasa E3) que reconoce el dominio de trans-activación de p53, el supresor tumoral, que da lugar a la ubiquitinilación y degradación de p53 por el proteosoma. Un inhibidor nutlina de la interacción p53-MDM2 puede dar lugar a la activación *in vivo* de la ruta de p53, y se ha sugerido que dichos agentes pueden tener potencial como agentes anti-cancerosos. Aquí, describimos la selección de dos péptidos bicíclicos (PEP10 y PEP48) frente a MDM2, un "antígeno" diana. La afinidad de cada péptido sintético fue submicromolar, y en el intervalo 250-750 nM. Se mostró por ELISA de competición que al menos uno de los péptidos se une al mismo sitio que un péptido lineal que previamente se había mostrado que bloqueaba la interacción p53-MDM2.

Los protocolos fueron generalmente como los descritos anteriormente en Heinis et al., 2009, Nature Chemical Biology 5, 502-507, a no ser que se indique otra cosa. En el trabajo de Heinis et al., ambas dianas, caliceína y cathepsina G, eran proteasas, y el inhibidor de caliceína es bastante resistente a proteólisis por caliceína, aunque incluye un sitio de escisión de caliceína. MDM2 no es una proteasa, y por lo tanto no estaba claro si los péptidos seleccionados también serían resistentes a proteasa. Por esto, y otras razones (para detalle véase más adelante), incluimos una o más etapas de proteasa (quimotripsina) después de la reacción de los repertorios de péptidos de fago con el TBMB (incluyendo en condiciones reductoras) y antes de la selección del repertorio frente a MDM2. Los dos péptidos de fago seleccionados PEP10 y PEP 48 aparecieron resistentes a proteólisis, como se muestra por ELISA de fago.

**Producción y purificación de fagos**

Se preparó la biblioteca de péptido de fago con diversidad de al menos  $4 \times 10^9$  clones y TBMB se conjugó como se ha descrito antes con unas pocas modificaciones.

1. La biblioteca cx6 de fago como se ha descrito antes (que se había preparado a partir de células TG1) se usó para infectar la cepa no supresora HB2151 (Carter, Bedouelle y Winter. 1985. Nucleic Acids Res. 13:4431-43), y las células infectadas se sembraron en placas. Las bacterias se rasparon de las placas en aproximadamente 8 ml de medio 2xTY, 30 ug/ml cloranfenicol, 10% glicerol (v/v).

2. Se añadieron aproximadamente 0,8 ml de la preparación madre a 800 ml de medio 2xTY con 30 ug/ml de cloranfenicol para obtener una DO de aproximadamente 0,1 a 600 nm. El cultivo se incubó a 30°C, y se agitó en un matraz de 2 litros a 200 rpm durante 16hrs.

3. El cultivo celular se centrifugó a 4.000 rpm (Megafuga Heraeus 2R) durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a 200 ml de 20% PEG frío, 2,5 M NaCl. La mezcla se dejó en hielo durante 1 hr.

4. El sobrenadante/mezcla de fago precipitado se centrifugó durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se desechó.

5. El fago se resuspendió en 35 ml PBS, 5mM EDTA seguido de centrifugación durante 15 min a 4.000 rpm (Megafuga Heraeus 2R) para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 50 ml.

**Modificación de fago con TBMB**

1. Se añadieron 5ml de 8mM TCEP (en H<sub>2</sub>O) al fago para obtener una concentración final 1mM TCEP. El tubo se invirtió varias veces para mezclar y se incubó durante 1hr en un baño de agua a 42°C.

2. El TCEP se eliminó por una segunda precipitación de PEG. Se añadieron 10 ml de 20% PEG, 2,5 M NaCl (disolución desgaseada), se mezcló, y se incubó en hielo durante 45 min y se centrifugó durante 30 min a 4.000 rpm, 4°C.

3. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y el sedimento se resuspendió en 12 ml PBS, 5mM EDTA, 10 uM TCEP (tampón desgaseado)

4. Se añadieron 3ml de 50 uM TBMB en acetonitrilo a los 12 ml de fago reducido para obtener una concentración final de TBMB de 10 uM. El tubo se invirtió varias veces y se dejó a 30°C durante 1 hr en un baño de agua. Los fagos se enfriaron en hielo y se precipitaron con 1/5 de volumen de 20% PEG, 2,5 M NaCl durante 30 min. Los fagos se recogieron centrifugando a 4.000 rpm (Megafuga Hereaus 2R) durante 20 min. El sobrenadante se eliminó y los fagos se resuspendieron en 4 ml de PBS. El fago se transfirió a los tubos Eppendorf de 2ml y se centrifugó a 13.000 rpm (centrífuga de mesa Eppendorf) durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se midió la infectividad de los fagos.

**Selección de fagos: protocolo general****Primera ronda de selección**

1. El fago purificado y conjugado químicamente como anteriormente se seleccionó frente a péptido MDM2 biotinilado (bio-MDM2) (res 2-125) inmovilizado en la superficie de las Dynabeads recubiertas de estreptavidina (Dyna)

Biotech). Se lavaron 80 µl de los lechos en primer lugar y se bloquearon con 2 % (p/v) de leche en polvo Marvell en PBS (PBSM) durante 40 min seguido de incubación con 100 nM bio-MDM2 durante 20 min en un volumen total de 1 ml.

2. Los fagos modificados químicamente ( $10^{10}$ - $10^{11}$  TU) se incubaron con PBSM durante 40 min.
- 5 3. Los lechos recubiertos con Ag bloqueados de la etapa 1 se lavaron de exceso del Ag con 0,1% Tween en PBS (PBST) y se incubaron con los fagos bloqueados durante 30 min en un volumen total de 1 ml.
4. Los fagos no unidos se lavaron con 10x con PBST seguido de 2x con PBS. Después de cada tercera etapa de lavado los lechos recubiertos con fago se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf.
- 10 5. Los fagos se eluyeron incubando con 500 µl de 50 mM glicina pH 2,2 durante 10 min en una rueda giratoria. Los fagos eluidos se neutralizaron con 250 µl de 1M Tris, pH7,5.
6. Se incubaron 375 µl de fagos con 10 ml de células HB2151 durante 90 min a 37°C sin agitación.
7. Las células infectadas se agitaron durante 30 min a 37°C y se sembraron en placas en una placa de cloranfenicol (20x20 cm).
- 15 8. Las colonias se rasparon de la placa en 2xTY, cloranfenicol, 10% glicerol como se ha descrito anteriormente, y se almacenaron como una preparación madre en glicerol a -80°C. Una fracción de las células se uso para preparar fagos para la segunda ronda de selección.

#### Segunda ronda de selección

La segunda ronda de selección fue similar a la primera excepto por unas pocas modificaciones.

1. Se usaron lechos magnéticos recubiertos con neutraavidina en lugar de los de estreptavidina.
- 20 2. La cantidad de antígeno usada en la selección fue 20 nM.
3. Los fagos modificados químicamente ( $10^{10}$ - $5 \times 10^{10}$  TU) se trataron en primer lugar con 50 µg/ml de quimotripsina durante 2 min seguido de bloqueo con PBSM durante 40 min.
4. Los fagos no unidos se lavaron con 15x con PBST seguido de 2x con PBS, lo demás como anteriormente.

#### **Selección de fagos: protocolo variante**

- 25 El clon 48 se seleccionó usando el protocolo general como anteriormente, mientras el clon 10 se desarrolló como un resultado de un protocolo modificado que se introdujo. Las modificaciones son las siguientes:
  1. En la primera ronda, los fagos modificados químicamente se pre-trataron con 50 µg/ml de quimotripsina durante 2 min seguido de bloqueo con PBSM durante 40 min.
  2. En la segunda ronda, los fagos modificados químicamente se redujeron en primer lugar con 5mM DTT durante 20 min seguido de incubación con 50 µg/ml de quimotripsina durante 2 min y bloqueo con PBSM durante 40 min.

#### **Síntesis peptídica**

Los péptidos codificados del clon 48 de fagos y clon 10 de fagos se sintetizaron con extremos N y C libres. PEP10: H-Ser-Cys-Glu-Leu-Trp-Asn-Pro-Lys-Cys-Arg-Leu-Ser-Pro-Phe-Glu-Cys-Lys-Gly-OH; PEP48: H-Ser-Cys-Val-Arg-Phe-Gly-Trp-Thr-Cys-Asp-Asn-Ser-Trp-His-Gly-Cys-Lys-Gly-OH.

- 35 Las síntesis se realizaron por síntesis peptídica Fmoc en un sintetizador de péptidos microondas CEM Liberty en 0,1 mmoles de resina Fmoc-Gly-PEG PS usando un exceso de 5 veces de aminoácidos Fmoc activados con PyBop en DMF y DIPEA en NMP (1 equivalente y 2 equivalentes respectivamente. Los grupos protectores de la cadena lateral fueron como sigue: Arg(Pbf); Asn(Trt); Asp(OtBu); Cys(Trt); Glu(OtBu); Lys(Boc); Ser(tBu); Thr(tBu); Trp(Boc). La desprotección Fmoc se llevó a cabo usando 20% v/v Piperidina/DMF que contenía 0,1M HOBt. Las resinas H-peptidil se lavaron con DMF, después propan-2-ol y se secaron *in vacuo*. La escisión de los grupos protectores de la cadena lateral y del soporte se efectuó usando 94:2,5:2,5:1 v/v/v/v TFA/EDT/H<sub>2</sub>O/iPr<sub>3</sub>SiH durante 2 horas. La mezcla péptido/TFA se filtró para eliminar el soporte y la mezcla péptido/TFA se diluyó con agua y se lavó con Et<sub>2</sub>O (5 veces) y la capa acuosa se liofilizó.
- 40 Se realizaron hplc en fase reversa en una columna Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å 250x4,6mm. Tampón A: 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O; Tampón B: CH<sub>3</sub>CN que contenía 10% Tampón A. La columna se eluyó isocráticamente con 10% Tampón B durante 2 minutos, entonces con un gradiente lineal de 10-90% durante 25 minutos. La detección fue a 215/230nm; velocidad de flujo de 1,5ml/min.

Los péptidos se liofilizaron y se evaluaron por espectrometría de masas. PEP10 MALDI-TOF masa (M+H): 2.099,9Da (Teoría: 2.098,4Da.) PEP48 MALDI-TOF Masa (M+H): 2.043,8Da (Teoría: 2.042,8Da.). Los péptidos se conjugaron con TBMB.

### **Síntesis de conjugados TBMB-péptido**

5 Se llevaron a cabo reacciones iniciales para mimetizar las condiciones usadas durante la selección de fagos. Típicamente, se disolvieron 5mg del péptido purificado en 1ml de agua y se añadieron 0,8 ml de 50mM  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$ , seguido de 40 $\mu\text{l}$  de TCEP. Se añadió a la reacción TBMB (3 equivalentes tomando como base el peso del péptido) disuelto en MeCN. La reacción se dejó durante 1,5 hrs y se monitorizó por HPLC. Al finalizar, la reacción se purificó por HPLC. Típicamente, se obtuvieron 0,5 a 1,5 mg de producto final. Este método da lugar a muchos subproductos, siendo el producto principal la masa deseada + 250 amu. Éste corresponde a la adición de TCEP al producto deseado, y que el rendimiento de este producto se incrementa con el tiempo de reacción. Además, se observaron otros productos de masa mayor correspondientes a la adición de un segundo TBMB por espec masa MALDI-TOF, pero no se aislaron.

15 Tomando como base la formación de aductos de TCEP, se desarrolló un método preferido. Después de la escisión del péptido de la resina, se purificó bien directamente por HPLC o se pre-trató con TCEP durante 15 mins antes de la purificación por HPLC. El producto de la reacción de HPLC, en el tampón de elución de HPLC (típicamente 6 ml) se neutraliza con 50 mM  $\text{NH}_3\text{HCO}_3$  (4 ml) y se añade TBMB en MeCN como anteriormente. La adición de 10% THF resulta en una disolución clara y, por lo tanto, acelera la reacción. Las reacciones se monitorizan por espec masa, pero típicamente finalizan en 1-2 hrs. Hay subproductos mínimos a partir de esta reacción (aunque se observa la presencia de producto +16 por espec masa). La reacción requiere concentración para eliminar disolventes orgánicos antes de la purificación por HPLC, de otra forma el producto tiende a eluir con el frente del disolvente. Los rendimientos de producto a partir de este método son típicamente 0,5 a 1,5 mg a partir de 3 mg de péptido, pero esto no se ha optimizado.

### **Ensayos de unión**

#### **25 Ensayo de ELISA de fago**

Se inmovilizaron 0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptido MDM2 biotinilado (res 2-125) en una placa recubierta con estreptavidina (Roche). La placa se bloqueó con PBSM (pero 4% en leche en polvo) y se incubó fago lineal o conjugado con TBMB ( $10^7$  TU/pocillo en PBSM en presencia o ausencia de 5 mM DTT) en la placa durante 50 min a temperatura ambiente. De manera similar, el fago se redujo en primer lugar en 5 mM DTT durante 20 min, se trató con quimotripsina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS) durante 2 min, se mezcló con PBSM (concentración final) y se incubó en la placa durante 50 min a temperatura ambiente. El fago se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-M13-HRP (1:5.000, Amersham).

35 Los resultados (Fig. 1) mostraron cualitativamente que ambos clones de fago 10 y clon 48 se unen a MDM2 como el conjugado cíclico pero no como el péptido no conjugado (ya esté pretratado o no con DTT). Además, la unión del péptido conjugado resiste la proteólisis. Obsérvese que 5 mM DTT puede reducir los enlaces disulfuro de la quimotripsina dando lugar a su inactivación como una proteasa. Para asegurar que la quimotripsina era activa en las condiciones del ensayo, incubamos fagos control que presentaban un péptido lineal que se une a MDM2 después de pre-tratamiento como anteriormente con 5 mM DTT. En las condiciones de nuestro experimento, la actividad de unión de los fagos control se perdió en proteólisis. En otros experimentos, hemos usado hasta 0,2 mM-5 mM TCEP en presencia de quimotripsina (0,1 mg/ml-1 mg/ml) durante 2 minutos a temperatura ambiente en PBS. Estas condiciones también nos permitieron distinguir entre los péptidos lineales y cíclicos en los fagos.

#### **Medidas de anisotropía de fluorescencia**

45 Se realizaron experimentos de titulación en un fluorímetro Horiba Jobin Yvon equipado con el titulador Hamilton Microlab controlado por software de laboratorio. Las  $\lambda_{\text{ex}}$  y  $\lambda_{\text{em}}$  usadas fueron 295 nm y 350 nm, respectivamente. Las anchuras de ranura para la excitación y emisión fueron 5 nm y 15 nm y se usó el tiempo de integración 10s para cada medida. La fluorescencia intrínseca del triptófano en los péptidos 10, 48 se usó para medir su afinidad de unión para MDM2 (res 2-125). Los experimentos se llevaron a cabo a 23°C en PBS, 5 mM DTT. Habitualmente, se titularon 250  $\mu\text{l}$  de MDM2 (150  $\mu\text{M}$ ) en 1,2 ml de péptido (1  $\mu\text{M}$ ). Los datos de titulación se analizaron con un modelo de unión estándar 1:1 usando la solución cuadrática para el equilibrio  $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$ .  $K_d$  es la velocidad de disociación, y [A] y [B] se refieren a la concentración de un titulante (MDM2) y péptidos fluorescentes 10 y 48, respectivamente. La ecuación de ajuste contenía un término extra para tener en cuenta la deriva lineal.

Los resultados (Fig. 2 y más adelante) indican que la afinidad de cada péptido es sub-micromolar, y en el intervalo 250-750 nM. Las medidas para PEP48 se repitieron.

PEP10+MDM2,  $\lambda_{\text{ex}}$  medida=295 nm,  $K_d$ =267 nM;

55 PEP48+MDM2,  $\lambda_{\text{ex}}$  medida=280 nm,  $K_d$ =760 nM;

PEP48+MDM2,  $\lambda_{ex}$  medida=295 nm, Kd=567 nM

Ensayos de competición

5 La unión de fago PEP48 a MDM2 fue competida por un péptido pMI (TSFAEYWNLSP) que se une a MDM2 en el sitio p53 con una Kd = 3,3 nM (Pazgier et al., 2009 PNAS, 106, 4665-4670). Se inmovilizaron 0,6 µg/mL de péptido MDM2 biotinilado (res 2-125) en una placa recubierta con estreptavidina (Roche). La placa se bloqueó con PBSM. Se premezcló fago conjugado con TBMB ( $10^7$  TU/pocillo en 1% PBSM) con un intervalo de concentraciones de pDI (de 6,94 nM a 1 µM) y se incubó en la placa durante 75 min a temperatura ambiente. El fago se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-M13-HRP (1:5.000, Amersham). La unión de fago PEP48 a MDM2 se inhibió por la adición del péptido pMI, con una CI50 estimada = 125 nM.

10 **Ejemplo 2. Resistencia a proteasa de péptidos bicíclicos**

Los péptidos bicíclicos PK15 y CG4 de Heinis et al., 2009, se seleccionaron frente a las proteasas calicreína y catepsina G, respectivamente, y no sería sorprendente si los péptidos bicíclicos fueran resistentes a digestión por estas proteasas, particularmente la naturaleza restringida del andamio debería ayudar a proteger frente al ataque proteolítico.

15 Comparamos PK15 lineal (cisteínas tratadas con yodoacetamida) con PK15 conjugado con el andamio TBMB, con calicreína y con otras proteasas, véase la Tabla más adelante (la escala varía de +++ (sustancialmente intacto) a - (completamente escindido). Como se esperaba, el conjugado de PK15 con TBMB fue más resistente que el lineal al ataque por calicreína. El factor fue aproximadamente 100 veces, como se muestra comparando diferentes concentraciones de la enzima.

20 Para las demás proteasas, el factor varió entre 10 y 100 veces, dependiendo de la proteasa. También comparamos la resistencia de CG4L1-PK15L1 bicíclico (WO 2009/098450) a la proteolisis. En este caso, el factor varió entre 1 y más de 100 veces, dependiendo de la proteasa. Así, el conjugado tiene una resistencia incrementada a proteasas distintas de la proteasa (calicreína) a la que se expuso durante el proceso de selección.

25 La variación de la resistencia según la proteasa sugiere que es deseable incluir una etapa de proteolisis en el proceso de selección o cribado, como ya se ha descrito en el Ejemplo 1. Lo más deseable será usar una proteasa que sea activa en las condiciones en las que se usará el péptido bicíclico, por ejemplo en presencia de suero. Por interés, evaluamos la resistencia de PK15 a suero. Esto mostró que el PK15 lineal se digiere por las proteasas en el suero a 37°C en aproximadamente 2 horas. Sin embargo, el conjugado de PK15 resiste la proteolisis durante al menos 48 horas; todavía tienen que ensayarse tiempos más largos.

30 Tabla: Digestión de conjugado peptídico con varias proteasas

	PK15 lineal	PK15-TBMB	CG4L1-PK15L1 lineal	CG4L1-PK15L1 TBMB
<b>Catepsina G</b>				
1	-	++	-	++
0,1	-	+++	-	+++
0,01	+/-	+++	-	+++
<b>Quimotripsina</b>				
10	-	++	-	-
1	-	+++	-	+
0,1	+	+++	-	++
0,01	+++	+++	++	+++
<b>Calicreína</b>				
1	-	+++	-	++
0,1	+	+++	-	+++
0,01	+++	+++	-	+++

Pronasa				
10	-	+	+	++
1	+/-	++	++	+++
0,1	++	+++	++	+++
0,01	+++	+++	+++	+++
Proteínasa K				
10	-	++	-	+/-
1	+/-	+++	+	+
0,1	+	+++	+	+
0,01	++	+++	++	++
Subtilisina				
9	-	-	-	-
0,9	-	+	-	+/-
0,09	++	++	-	+
0,009	+++	+++	-	+++
Tripsina				
10	-	-	-	-
1	-	+	-	+
0,1	+/-	++	-	++
0,01	+	+++	+/-	+++

Los números corresponden al número de  $\mu\text{g}$  de enzima por reacción

### Métodos

Para los métodos, véase el Ejemplo 3 siguiente. La proteólisis se realizó a 37°C. Las reacciones con catepsina G y calicreína se llevaron a cabo en 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA, 0,01% Tritón X100, 5% DMSO. Las reacciones con quimotripsina se llevaron a cabo en 100 mM Tris pH 7,4, 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Las reacciones con pronasa y proteinasa K se llevaron a cabo en 100 mM Tris pH 7,4, 0,5% SDS. Las reacciones con subtilisina se llevaron a cabo en 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5. Las reacciones con tripsina se llevaron a cabo en 67 mM fosfato de sodio pH 7,6. Las condiciones de la reacción con suero implican disolver el péptido en 1xPBS (volumen total 24  $\mu\text{l}$ ) y 6  $\mu\text{l}$  de suero humano añadidos a la reacción.

### 10 Ejemplo 3. Sitios de escisión de tripsina y quimotripsina de PK15

Para identificar los sitios de escisión de tripsina y quimotripsina de PK15, usamos tanto el péptido derivatizado con yodoacetamida como el conjugado con TBMB, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Las condiciones de la proteólisis también fueron como se describen en el Ejemplo 2. Mediante análisis espectrométrico de masa, a partir de análisis de las masas moleculares de las especies escindidas, fuimos capaces de mostrar que el péptido derivatizado con yodoacetamida (AC\*SDRFRNC\*PADEALC\*G) R7 y R9 fueron ambos escindidos por tripsina, y F8 escindido por quimotripsina. Los mismos sitios de escisión se observaron en el péptido conjugado con TBMB, excepto que las escisiones se produjeron a una velocidad mucho más lenta como se indica en el Ejemplo 2. Además, con tripsina, la etapa de escisión inicial fue en R7, seguido en incubaciones más largas por la escisión en R9.

### 20 Métodos

Los péptidos y conjugados se purificaron en una columna Proteo C12 (4  $\mu\text{m}$ , Phenomenex) usando un HPLC Varian 940. Los tampones usados fueron 0,1% TFA (A) y 90% MeCN, 0,1% TFA (B). Generalmente, las muestras se eluyeron en un gradiente de tampón B 10-65% durante 23 minutos.

Para la conjugación de TBMB, usamos nuestras condiciones generales, que son como sigue. Se disolvieron 5-6 mg del péptido crudo después de la síntesis (véase el Ejemplo 1 para condiciones típicas de síntesis) en 600  $\mu$ l de agua (añadiendo 20  $\mu$ l de 10% disolución de amoníaco si es insoluble) seguido de 60  $\mu$ l TCEP y se dejó permanecer durante 20 mins. En dos inyecciones, el péptido reducido se purificó por HPLC (condiciones anteriores) recogiendo el péptido en aproximadamente 3-4 ml de tampón de elución. La disolución se neutralizó con un volumen igual de 100 mM tampón fosfato de amonio y se añadió 1 ml de acetonitrilo. Se disolvieron 10 equivalentes de TBMB en 1 ml de acetonitrilo y se añadieron al péptido reducido. El pH se monitorizó y se añadió 100 mM tampón fosfato de amonio adicional si el pH era ácido. Generalmente, las reacciones finalizaron en 20-30 minutos. La reacción se purificó por HPLC, cargando en primer lugar hasta 4,5 ml de la reacción en la columna equilibrada en 0,1% TFA, lavando durante 8 mins con 0,1% TFA y eluyendo de la columna como sigue. Las fracciones puras se liofilizaron y se disolvieron en agua (10% DMSO si era insoluble). Los productos y reacciones se monitorizan todo el rato por espectrometría de masa MALDI-TOF, desalando las mezclas de reacción usando un ZipTip. Los rendimientos del conjugado fueron típicamente 1-2 mg.

Para los conjugados con yodoacetamida usamos nuestras condiciones generales que son como sigue. Después de la síntesis, los péptidos crudos (5-6 mg) se disolvieron en agua (600  $\mu$ l) y se trataron con TCEP (60  $\mu$ l de 0,5M) durante 20 minutos antes de HPLC. La fracción purificada de HPLC (aproximadamente 3 ml) se neutralizó con un volumen igual de 100 mM bicarbonato de amonio y se trató con 10 equivalentes de yodoacetamida en 1 ml MeCN. En estas condiciones, las reacciones finalizan habitualmente en 30 minutos. La mezcla de reacción se purificó por HPLC directamente, cargando hasta 4,5 ml de la mezcla en la columna equilibrada con 0,1% TFA, lavando con 0,1% TFA durante 8 minutos y eluyendo como se ha descrito anteriormente.

Los péptidos (lineal y conjugados) se disolvieron en agua a una concentración de 1 mg/ml, proporcionando una concentración efectiva de  $\sim$ 0,5 mM de disoluciones madre y la concentración se determinó usando análisis de aminoácidos. Se disolvieron 2  $\mu$ l de los conjugados peptídicos (20  $\mu$ M concentración final) ( $\sim$ 30  $\mu$ M en reacciones dependiendo del peso molecular real) en tampón de reacción (véase más adelante) en un volumen total de reacción de 30  $\mu$ l, seguido de la proteasa (típicamente en el intervalo 1, 0,1 y 0,01  $\mu$ g por reacción), y las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hr. Se pararon alicuotas de 10  $\mu$ l en 10  $\mu$ l de 1% TFA. Las muestras se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF para identificar los picos de fragmentos y determinar así el sitio de escisión. Cuando existió ambigüedad respecto al sitio de escisión, las muestras se analizaron bien por MALDI-TOF-TOF (Bruker Ultraflex 3) o por Trampa de Iones Lineal (Thermoscientific Orbitrap XL) para determinar masas exactas.

#### 30 **Ejemplo 4. Cambios en el núcleo para resistir la proteolisis**

El conjugado biciclo PK15 es más resistente a la digestión por quimotripsina y tripsina que la forma lineal como se describe en el Ejemplo 2. Sin embargo, después de una incubación prolongada, se escinde en los residuos de arginina por tripsina y fenilalanina por quimotripsina, como se describe en el Ejemplo 3. Haciendo cambios en las cadenas laterales de los aminoácidos, puede ser posible proporcionar una resistencia adicional a la proteolisis. También puede ser posible hacer esto haciendo cambios en el núcleo peptídico como se describe aquí y se ejemplifica por la introducción cerca de los sitios de escisión, de un D-aminoácido, o N-metilación, o un enlace peptídico reducido. Así, para proporcionar resistencia en los sitios de escisión de proteasa de PK15, se sintetizaron las variantes siguientes:

40 H-ACSDR f RNCPADEALCG-OH (donde f representa D-Phe), y H-ACSDRF-(NMeArg)-NCPADEALCG-OH, y H-ACSDRF Y[CH<sub>2</sub>NH] RNCPADEALCG-OH (donde el Y[CH<sub>2</sub>NH] representa el enlace peptídico reducido).

En las descripciones siguientes de síntesis peptídica, las abreviaturas son como sigue. THF: tetrahidrofurano; NMM: N-metilmorfolina; IBCF: iso-butilcloroformato; DMF: N,N-dimetilformamida; DiPEA: diisopropiletilamina; TFA: ácido trifluoroacético; EDT: etano ditiol; PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio; PyBrOP: hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio.

45 El péptido D-Fenilalanina (H-ACSDR f RNCPADEALCG-OH) se sintetizó como se describe en el Ejemplo 1, añadiendo D-Phe en lugar de L-Phe.

El péptido NMe-Arginina, H-ACSDRF-(NMeArg)-NCPADEALCG-OH, se sintetizó en un sintetizador de péptidos automatizado CEM Liberty como se describe en el Ejemplo 1 hasta el aminoácido que precede la NMeArginina. La resina se recogió en una jeringa y después de desprotección del grupo Fmoc, se disolvieron 6 equivalentes de Fmoc-NMe-Arg(Mtr)-OH, 6 equivalentes de PyBOP y 12 equivalentes de DiPEA en 4 mL de DMF. La disolución se añadió a la resina y se agitó durante 40 minutos. La etapa se reproduce para un acoplamiento doble. Después, la desprotección de Fmoc se llevó a cabo usando 20% v/v Piperidina/DMF. Después de lavados con DMF (4 veces), se disolvieron 6 equivalentes de Fmoc-Phe-OH, 6 equivalentes de PyBrOP y 12 equivalentes de DiPEA en 4 mL de DMF. La disolución se añadió a la resina y se agitó durante 3 horas. La etapa se reproduce para un doble acoplamiento. Después, la resina se lava con DMF y se pone de nuevo en un sintetizador de péptidos CEM Liberty para completar la secuencia. La escisión de los grupos protectores de la cadena lateral y del soporte se efectuó usando 82,5:5:5:5:2,5 v/v/v/v/v TFA/Fenol/Tioanisol/agua/EDT toda la noche. La mezcla péptido/TFA se filtró para eliminar el soporte y la mezcla péptido/TFA se diluyó con agua y se lavó con Et<sub>2</sub>O (5 veces) y la capa acuosa se liofilizó

El péptido con enlace peptídico reducido, H-ACSDRF Y[CH<sub>2</sub>NH] RNCPADEALCG-OH, requirió en primer lugar la preparación de Fmoc-fenilalaninal. Se disolvieron 5 mmoles de Fmoc-Phe-OH en 10 mL de THF anhidro y se mantuvo a 15°C bajo nitrógeno. Se añadieron 5 mmoles de NMM y 5 mmoles de IBCF. Después de 15 min, la suspensión se filtró y se lavó con 2x5 mL de THF anhidro. Se añadieron gota a gota 5 mmoles de morfolina al filtrado y después de una hora, la reacción estaba finalizada. La mezcla se concentró en vacío y se añadió acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con una disolución de KHSO<sub>4</sub> 5%, después una disolución de KHCO<sub>3</sub> 5% y agua destilada, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró en vacío. La amida Weinreb obtenida se purificó por cromatografía flash en gel de sílice. Después, se disolvieron 1,95 mmoles del compuesto en 20 mL de THF anhidro y se pusieron en un baño de hielo bajo nitrógeno. Se añadieron 1,25 eq de LiAlH<sub>4</sub> y la reacción se evaluó por TLC de una alícuota hidrolizada separadamente con KHSO<sub>4</sub> acuoso. Después de 45 min, la reacción estaba finalizada y se paró con 5 mL de KHSO<sub>4</sub> acuoso. El compuesto se extrajo con éter dietílico y se usó sin ninguna purificación adicional.

Para la introducción del enlace reducido en la secuencia peptídica, el péptido se sintetizó, como en el Ejemplo 2, en un sintetizador de péptidos automatizado CEM Liberty hasta la arginina implicada en el enlace reducido. Después de desprotección del grupo Fmoc con 20% piperidina/DMF, se añadió una disolución de 3 eq de Fmoc-fenilalaninal en 5 mL de 1% AcOH en DMF al péptido soportado en la resina en una jeringa. Después, se añadieron 3 eq de NaBH<sub>3</sub>CN por partes durante 1 hora. La reacción se agitó toda la noche, la resina se lavó con DMF y se puso de nuevo en el Sintetizador CEM Liberty para completar la secuencia.

La escisión de los grupos protectores de la cadena lateral y del soporte se efectuó usando 94:2,5:2,5:1 v/v/v/v TFA/EDT/H<sub>2</sub>O/iPr<sub>3</sub>SiH durante 2 horas. La mezcla péptido/TFA se filtró para eliminar el soporte y la mezcla péptido/TFA se diluyó con agua y se lavó con Et<sub>2</sub>O (5 veces) y la capa acuosa se liofilizó.

Después de la purificación, los péptidos se conjugaron con TBMB y se ensayaron para inhibición de la actividad caliceína, como sigue:

Las enzimas se adquirieron en Sigma Aldrich y los sustratos en Bachem AG. El tampón de ensayo está compuesto por 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA, 0,01% Tritón X100 y 5% DMSO. Las enzimas se incuban con los inhibidores durante 30 minutos a RT antes de la adición del sustrato. Todos los experimentos se registraron a 30°C durante 90 minutos.

Los ensayos se realizaron en un lector de placas BMG Pherastar a longitudes de onda de exc/em 350/450 nm. La caliceína se adquirió como una disolución de 1.080 µg/mL y se diluyó hasta una concentración de trabajo de 0,3 nM en tampón de ensayo. El sustrato Z-Phe-Arg-amc se solubilizó a la concentración madre de 10 mM en DMSO y se diluyó hasta una concentración de trabajo de 300 µM con tampón de ensayo. Los inhibidores se solubilizaron en tampón de ensayo hasta una concentración madre de 60 µM. Se introducen 50 µL de cada reactivo en pocillos para un volumen final de 150 µL por pocillo. La concentración final de caliceína en el ensayo es 0,1 nM y de sustrato es 100 µM.

Las concentraciones finales de los inhibidores fueron: 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 8 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 800 nM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 8 µM, 10 µM y 20 µM. La velocidad inicial de la reacción se obtiene representando los datos de fluorescencia = f (tiempo) y ajustando una línea de tendencia lineal para cada concentración de inhibidor. Las curvas de inhibición se obtienen representando la velocidad inicial = f ([I]) y pueden evaluarse los valores de CI<sub>50</sub>.

Esto reveló que todos los péptidos inhibieron la actividad de caliceína; los valores para los péptidos H-ACSDRF RNCPADEALCG-OH, H-ACSDRF-(NMeArg)-NCPADEALCG-OH y H-ACSDRF Y[CH<sub>2</sub>NH] RNCPADEALCG-OH fueron respectivamente 4 µM, 3,1 µM, 16,6 µM.

Sin embargo, la alteración en el núcleo también dio lugar, como se esperaba, a una resistencia incrementada a la proteólisis (para los métodos, véase el Ejemplo 2). Usando las concentraciones más altas de tripsina (0,1 µg) descritas en el Ejemplo 2, donde el conjugado PK 15 TBMB se escinde completamente en 5 min en R7, los tres conjugados (con núcleo modificado) péptido TBMB no fueron escindidos. De hecho, con 1 µg de tripsina, y después de 1 hora, hubo poca escisión o ninguna de cualquiera de los conjugados con TBMB con núcleo modificado. Usando las concentraciones más altas de quimotripsina (0,1 µg) descritas en el Ejemplo 2, donde el conjugado PK15 TBMB se escinde aproximadamente en un 50% después de 1 hr, los tres conjugados péptido TBMB con núcleo modificado no se escindieron. Con 1 µg de quimotripsina, donde el conjugado PK 15 TBMB se escinde completamente después de 1 hora, los conjugados con núcleo modificado estaban en gran medida (75-85%) intactos.

Así, los conjugados con núcleo modificado tienen una estabilidad mejorada frente a proteasas, sin embargo con alguna pérdida de afinidad de unión para la diana.

5 Todas las publicaciones mencionadas en la especificación anterior se incorporan en la presente memoria por referencia. Varias modificaciones y variaciones de los aspectos y realizaciones descritas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin alejarse del alcance de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe estar limitada excesivamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son evidentes para los expertos en la técnica, estén en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar uno o más ligandos peptídicos, que comprende polipéptidos unidos covalentemente a un andamio molecular en dos o más residuos de aminoácidos, que comprende las etapas de:
- 5 (a) presentar uno o más ligandos peptídicos en un sistema de presentación genético, en el que el polipéptido comprende dos o más grupos reactivos que forman una unión covalente con el andamio molecular, y al menos un bucle que comprende una secuencia de dos o más aminoácidos delimitados entre dos de dichos grupos reactivos;
- (b) exponer los ligandos peptídicos a más de una proteasa; y
- (c) cribar los ligandos peptídicos para unión frente a una diana, y seleccionar los ligandos que se unen a la diana y son resistentes a escisión por dichas más de una proteasas.
- 10 2. Un método para preparar uno o más ligandos peptídicos, que comprende polipéptidos unidos covalentemente a un andamio molecular en dos o más residuos de aminoácidos, que comprende las etapas de:
- (a) presentar uno o más ligandos peptídicos en un sistema de presentación genético, en el que el polipéptido comprende dos o más grupos reactivos que forman una unión covalente con el andamio molecular, y al menos un bucle que comprende una secuencia de dos o más aminoácidos delimitados entre dos de dichos grupos reactivos;
- 15 (b) cribar los ligandos peptídicos para unión frente a una diana sin una proteasa, y seleccionar los ligandos que se unen a la diana;
- (c) exponer los ligandos peptídicos que se unen a la diana a una o más proteasas; y
- (d) cribar adicionalmente para ligandos peptídicos que son resistentes a escisión por proteasa y se unen a la diana.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el sistema de presentación genético es presentación en fago.
4. Un método según la reivindicación 1, en el que los ligandos peptídicos que se unen a la diana se modifican adicionalmente por
- (a) modificación o sustitución de la cadena lateral de aminoácidos; o
- (b) modificación del núcleo polipeptídico.
- 25 5. Un método según la reivindicación 4, en el que la modificación del núcleo se selecciona del grupo que consiste en introducir, cerca del sitio de la escisión por proteasa, un D-aminoácido, un enlace peptídico reducido, y N-metilación.

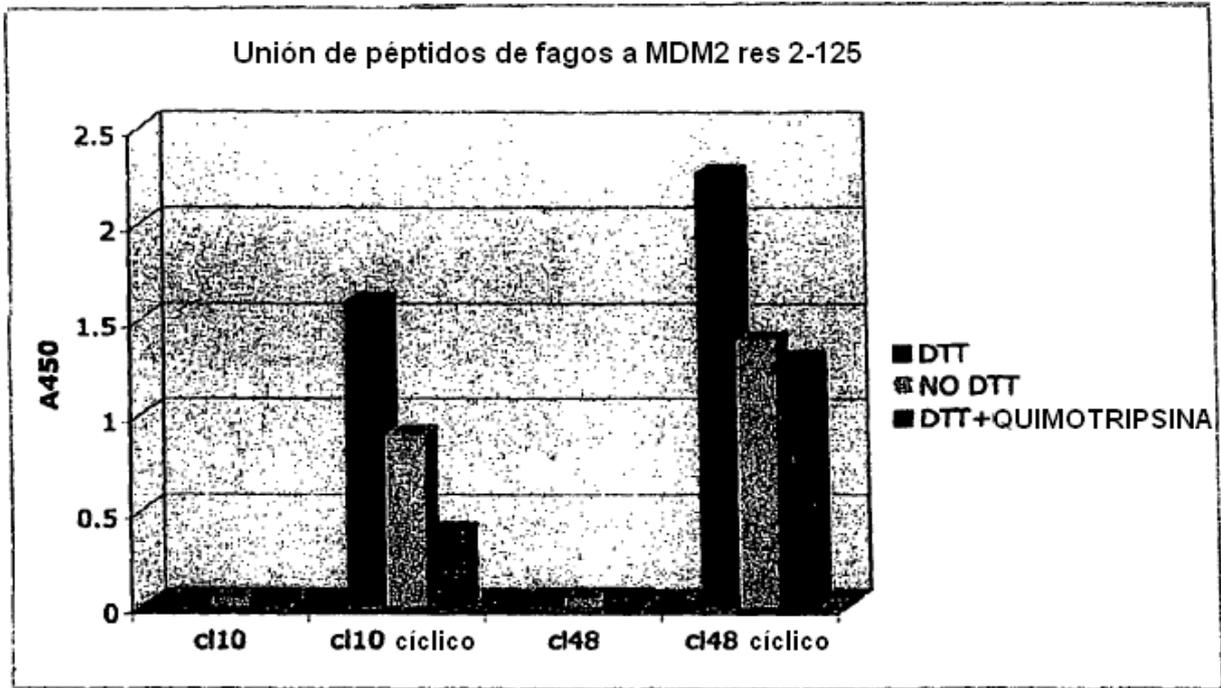


Figura 1

Unión del péptido 10 y 48 a MDM2 (res 2-125)

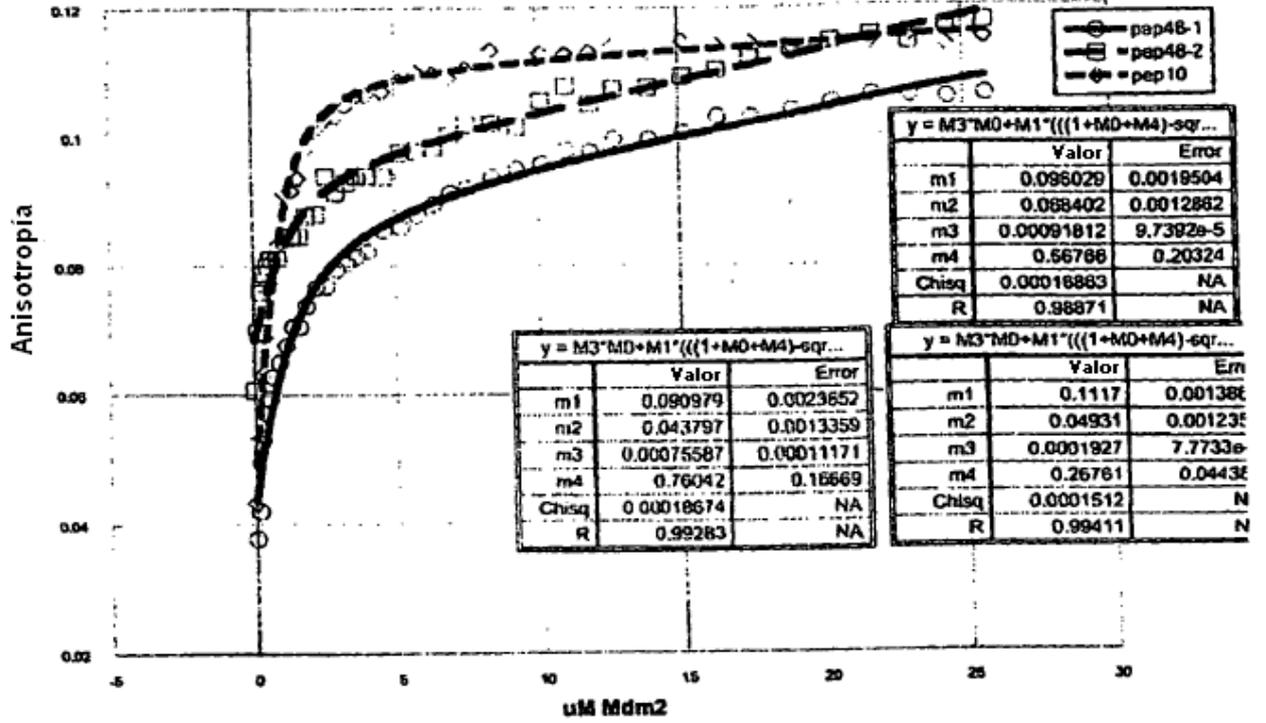


Figura 2