

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 896 398**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2010 PCT/EP2010/000691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10089117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2010 E 10703808 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021 EP 2393518**

54 Título: **Péptido policíclico estructurado**

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:
24.02.2022

73 Titular/es:

BICYCLERD LIMITED (100.0%)
B900, Babraham Research Campus
Cambridge, CB22 3AT, GB

72 Inventor/es:

HEINIS, CHRISTIAN;
TOUATI, JEREMY y
WINTER, GREGORY, PAUL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 896 398 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

Péptido policíclico estructurado

La invención se refiere a ligandos peptídicos cuya estructura está constreñida por la unión a un compuesto que proporciona un esqueleto estructural, que imparte una conformación a los ligandos peptídicos. En particular, la invención se refiere a péptidos que adoptan una conformación policíclica mediante ciclación de extremo con extremo y unión a un núcleo estructural multidentado.

Introducción

La generación de moléculas con alta afinidad y especificidad para dianas biológicas es un problema fundamental en las ciencias química, biológica y farmacéutica. En particular, los ligandos de unión son importantes para la creación de fármacos que puedan intervenir en procesos biológicos. La creación de ligandos que se unan a un ligando diana elegido implica habitualmente un procedimiento de generación de una pluralidad de moléculas de unión putativas y la prueba de dichas moléculas con respecto a sus propiedades de unión.

Se conocen en la técnica polipéptidos fijados a una estructura molecular sintética (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 sobre andamiajes sintéticos para un mimetismo estructural de superficies proteínicas (Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005). Métodos para la generación de posibles compuestos farmacológicos, en donde dichos compuestos se generan al ligar polipéptidos que contienen cisteína a un andamiaje molecular como, por ejemplo, tris(bromometil)benceno, se divulgan en los documentos WO 2004/077062 y WO 2006/078161.

El documento WO2004/077062 divulga un método para seleccionar un posible compuesto farmacológico. En particular, este documento divulga diversas moléculas de andamiaje que comprenden grupos reactivos primero y segundo, y la puesta en contacto de dicho andamiaje con una molécula adicional para formar al menos dos enlaces entre el andamiaje y la molécula adicional en una reacción de acoplamiento.

El documento WO2006/078161 divulga compuestos de unión, compuestos inmunogénicos y peptidomiméticos. Este documento divulga la síntesis artificial de diversas colecciones de péptidos tomados de proteínas existentes. A continuación, estos péptidos se combinan con un péptido sintético constante que tiene algunos cambios de aminoácidos introducidos a fin de producir bibliotecas combinatorias. Al introducir esta diversidad a través de ligazón química a péptidos separados que presentan diversos cambios de aminoácidos, se proporciona una oportunidad incrementada para encontrar la actividad biológica deseada. La Figura 7 de este documento muestra una representación esquemática de la síntesis de diversas construcciones de péptidos en forma de bucle. Sin embargo, los péptidos producidos tienen especificidades individuales. Cuando se proporcionan múltiples péptidos, los bucles cooperan para unirse a una diana individual.

En la solicitud de patente internacional en tramitación junto con la presente WO2009098450 se divulga el uso de una tecnología de selección biológica, tal como presentación en fagos, para seleccionar ligandos peptídicos fijados a estructuras moleculares sintéticas. Estos ligandos peptídicos muestran especificidad para moléculas diana. El documento WO2004/077062 describe ligandos peptídicos que tienen una variedad de bucles subtendidos entre puntos de empalme en un andamiaje molecular. Aunque este documento analiza la ciclación de péptidos, usa este término para definir péptidos unidos a un andamiaje, sean circulares o no. En general, en la técnica anterior, un péptido lineal puede estar subtendido entre (n+1) puntos de empalme para generar n bucles.

Los péptidos cíclicos sintéticos se producen típicamente al conectar los extremos de péptidos protegidos en la cadena lateral, lo que permite el uso de una amplia gama de químicas de ligación. En algunos casos, los precursores peptídicos lineales se producen mediante expresión recombinante, como, por ejemplo, polipéptidos con cadenas largas (> 50 aminoácidos) que son difíciles de sintetizar químicamente o bibliotecas de péptidos combinatorias que se generan mediante presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación en levaduras u otras técnicas de presentación. La ciclación de estos péptidos no protegidos es más exigente y requiere estrategias y reactivos de ligación que sean ortogonales a los péptidos.

Los presentes inventores muestran en la presente memoria que la formación de ligandos multicíclicos, esto es ligandos que comprenden n bucles subtendidos entre n puntos de empalme sobre un andamiaje molecular, puede tener lugar si el péptido se cicla al enlazar los extremos N y C, formando n bucles.

Compendio de la invención

La divulgación proporciona un ligando peptídico que comprende un polipéptido ligado a un andamiaje molecular en n puntos de empalme, en donde dicho polipéptido está ciclado y forma n bucles separados subtendidos entre dichos n puntos de empalme sobre el andamiaje molecular, en donde n es mayor de o igual a 2.

Preferiblemente, el polipéptido se cicla mediante fusión del extremo N al C, y se puede ciclar antes o después del empalme al andamiaje molecular. Se prefiere el empalme antes de la ciclación.

Se conocen en la técnica varios métodos para la ciclación de péptidos. Por ejemplo, el polipéptido se cicla mediante reticulación N-C, usando un agente de reticulación tal como EDC.

- 5 En otro aspecto, el péptido se puede diseñar para comprender un aminoácido derivado en N^α o C^α protegido, y ciclar mediante desprotección del aminoácido derivado en N^α o C^α protegido para acoplar dicho aminoácido al extremo opuesto del polipéptido.

- 10 En un aspecto preferido, el polipéptido se cicla por medios enzimáticos. Por ejemplo, la enzima es una transglutaminasa, a modo de ejemplo una transglutaminasa microbiana, tal como transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis*. A fin de beneficiarse de la ciclación enzimática, puede ser necesario incorporar en el polipéptido una secuencia de sustrato N y/o C-terminal para la enzima. Algunas o todas de la secuencia o las secuencias de sustrato se pueden eliminar durante la reacción enzimática, lo que significa que el polipéptido ciclado puede no comprender las secuencias de sustrato en su configuración final.

- 15 En un aspecto, el ligando peptídico es multiespecífico, y es capaz de unirse a más de una diana separada. En una realización preferida, el bucle formado por la ciclación del polipéptido se une a una diana que es diferente a la unida con al menos otro bucle. Esto confiere un número de ventajas, ya que la ciclación se puede realizar en cualquier momento cuando se desee impartir al ligando peptídico la capacidad de unirse a otra diana.

- 20 Si el ligando peptídico se construye mediante el ensamblaje de diferentes bucles de especificidad conocida en un polipéptido, la multiespecificidad puede estar determinada por el número de bucles. Por ejemplo, si el ligando peptídico comprende tres bucles cuando está ciclado, puede ser mono-, bi- o trispecífico. Las dianas pueden ser entidades moleculares completamente diferentes, epítomos diferentes sobre la misma molécula o múltiples copias de la misma molécula.

El valor de n puede ser 2 o más, y es ventajosamente 3. Se prevén ligandos peptídicos con números superiores de bucles, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8 o más.

- 25 La invención proporciona un directorio de ligandos peptídicos como el descrito en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

- 30 Según la invención, el directorio se presenta usando un sistema de presentación genética. Sistemas aplicables incluyen presentación en fagos, presentación bacteriana, presentación en levaduras, presentación en ribosomas o polisomas, 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 de 2008 vol. 105 n° 40; 15293-15298. La técnica preferida es la presentación en fagos usando un bacteriófago filamentosos.

El directorio puede ser simple o se puede haber seleccionado con respecto a la unión a una o más dianas. La selección con respecto a la unión a una o más dianas se puede llevar a cabo antes de la ciclación, después de la ciclación o ambos.

35 Breve descripción de las figuras

- 40 **Figura 1.** Ciclación de péptidos lineales con transglutaminasa microbiana (MTGasa). (A) Representación esquemática de la reacción catalizada por enzima. Las cadenas laterales de los residuos de glutamina y lisina de un péptido lineal se ligan mediante la MTGasa para dar un péptido cíclico con un enlace amida estable. (B) Espectros de masas del péptido 1 (H-WALQRPHGGS-NH₂; los residuos de glutamina y lisina que participan en la reacción están subrayados) antes y después de la incubación con MTGasa.

- 45 **Figura 2.** Actividad y especificidad para el sustrato de la MTGasa. (A) El péptido 3 (negro) y el 4 (blanco) se incubaron con diferentes concentraciones de MTGasa. La eficacia de ciclación indicada como % de péptido cíclico se determinó mediante LC/MS. (B) SDS-PAGE de albúmina sérica bovina (BSA; 5 µg) tratada con diferentes concentraciones de MTGasa. No se observó reticulación de BSA a través de ligazón de residuos de glutamina y lisina expuestos superficialmente.

Figura 3. Reacción de desamidación. (A) Representación esquemática de la transformación de glutamina en residuo de glutamato en el péptido 6 por MTGasa. (B) Espectros de masas del péptido 6 antes y después de la incubación con MTGasa. Se muestran en cada espectro las especies monocargadas, [M+H]⁺.

- 50 **Figura 4.** Generación de péptidos tricíclicos. (A) Representación esquemática de la reacción de transglutaminación que liga los apéndices terminales de un péptido bicíclico. (B) Estructura química de un péptido tricíclico obtenido al hacer reaccionar posteriormente el péptido 7 con tris-(bromometil)benceno (TBMB) y tratamiento con MTGasa. (C) Espectros de masas del conjugado péptido 7-TBMB antes y después del tratamiento con MTGasa.

Figura 5. Propensión de los péptidos bi- y tricíclicos a la escisión con aminopeptidasa. Análisis espectrométrico de masas del péptido 7 bicíclico (A) y tricíclico (B) tratado con diferentes cantidades de leucil aminopeptidasa

procedente de *Aeromonas Proteolytica*. Las diferencias de masas corresponden a la pérdida de aminoácidos exocíclicos presentes en el extremo N del péptido. Se indica la cantidad de aminopeptidasa añadida a las reacciones (en ng).

5 La **Figura 6** muestra una gráfica de anisotropía de fluorescencia para el péptido doblemente específico que comprende bucles procedentes de PEP48 y PK15.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por los expertos normales en la técnica, tal como en las técnicas de la química de péptidos, el cultivo celular y la presentación en fagos, la química de los ácidos nucleicos y la bioquímica. Se usan técnicas estándar para la biología molecular, los métodos genéticos y los bioquímicos (véanse 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.).

10

Un ligando peptídico, según se menciona en la presente memoria, se refiere a un péptido unido covalentemente a un andamiaje molecular. Típicamente, estos péptidos comprenden dos o más grupos reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes con el andamiaje, y una secuencia subtendida entre dichos grupos reactivos que se denomina la secuencia en bucle, puesto que forma un bucle cuando el péptido se une al andamiaje.

15

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

20 La multiespecificidad es la capacidad para unirse a dos o más dianas. Típicamente, los péptidos de unión son capaces de unirse a una sola diana, tal como un epítipo en el caso de un anticuerpo, debido a sus propiedades de conformación. Sin embargo, se pueden desarrollar péptidos que se puedan unir a dos o más dianas; anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, como se sabe en la técnica según se menciona 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 biespecíficos. La unión puede ser independiente, lo que significará que los centros de unión para las dianas sobre el péptido no estén estructuralmente dificultados por la unión de una u otra de las dianas. En este caso, ambas dianas se pueden unir independientemente. Más generalmente, se espera que la unión de una diana impida al menos parcialmente la unión de la otra. Se pueden formar péptidos multiespecíficos al enlazar entre sí bucles individuales de ligandos peptídicos que se unen a dianas individuales. Los bucles que se enlazan entre sí pueden ser bucles adyacentes, o pueden estar separados por un tercer bucle, o incluso bucles adicionales. Cuando los bucles están situados directamente adyacentes en el péptido multiespecífico, se prefiere que se omita uno de los grupos reactivos que definen uno de los bucles, para evitar la duplicación efectiva de grupos reactivos en una posición.

25

Una diana es una molécula o parte de la misma a la que se unen los ligandos peptídicos. Típicamente, la diana será análoga a un epítipo y así puede tomar la forma de diferentes epítipos sobre la misma molécula o diferentes epítipos sobre dianas moléculas diferentes. Cuando las dianas están sobre la misma molécula, el uso de un ligando biespecífico incrementará la avidéz del ligando por la molécula, y puede impartir otras propiedades debido a la reticulación de la molécula o la ocupación de partes funcionales definidas de la molécula.

35

El andamiaje molecular es cualquier molécula que sea capaz de conectarse al péptido en múltiples puntos para impartir una o más particularidades estructurales al péptido. No es un reticulador ya que no reemplaza simplemente a un enlace disulfuro; en cambio, proporciona dos o más puntos de empalme para el péptido. Preferiblemente, el andamiaje molecular comprende al menos tres puntos de empalme para el péptido, denominados grupos reactivos del andamiaje. Estos grupos son capaces de reaccionar con los grupos reactivos del péptido para formar un enlace covalente. Estructuras preferidas para andamiajes moleculares se describen posteriormente.

40

Un directorio es una colección de variantes, en este caso variantes de polipéptidos, que difieren en su secuencia. Típicamente, la localización y la naturaleza de los grupos reactivos no variará, pero las secuencias que forman los bucles entre ellos pueden estar aleatorizadas. Los directorios difieren en tamaño, pero se debe considerar que comprenden al menos 10^2 miembros. Se pueden construir directorios de 10^{11} o más miembros.

45

El cribado con respecto a la actividad de unión (o cualquier otra actividad deseada) se efectúa según métodos bien conocidos en la técnica, a modo de ejemplo, a partir de la tecnología de presentación en fagos. Por ejemplo, se pueden usar dianas inmovilizadas a una fase sólida para identificar y aislar miembros de un directorio. El cribado permite la selección de miembros de un directorio según características deseadas.

50

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 sola secuencia de polipéptido o ácido nucleico. En este sentido, biblioteca es sinónimo de directorio. Las diferencias de secuencia entre miembros de una biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tomar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus,

55

células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene solamente uno o un número limitado de miembros de la biblioteca.

Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, a fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. Por lo tanto, en un aspecto preferido, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos anfitriones, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un solo miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que se puede expresar para producir su miembro polipeptídico correspondiente. Así, la población de organismos anfitriones tiene el potencial de codificar un gran directorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.

Preferiblemente, una biblioteca de ácidos nucleicos codifica un directorio de polipéptidos. Cada miembro de ácido nucleico de la biblioteca tiene preferiblemente una secuencia relacionada con uno o más de otros miembros de la biblioteca. Por secuencia relacionada se entiende 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. La identidad se juzga adecuadamente a través de un segmento contiguo de al menos 3 aminoácidos, adecuadamente al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 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.

Un grupo funcional, empalmado a un ligando peptídico, es un grupo que, por ejemplo, media en una actividad de unión adicional o permite la unión de un grupo efector. Así, grupos funcionales incluyen anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, ligandos peptídicos adicionales como los descritos en la presente memoria, grupos reactivos químicos y similares.

Un grupo efector es un grupo empalmado al ligando peptídico que tiene una actividad específica. A modo de ejemplo, puede ser una proteína que incrementa la semivida del ligando peptídico, tal como albúmina sérica humana (HSA). Grupos efectores también incluyen fármacos, tales como fármacos citotóxicos, inmunoeffectores, tales como regiones Fc de anticuerpos, y compuestos que se ajustan a los siguientes parámetros: no más de 5 donantes de enlaces de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno con uno o más átomos de hidrógeno); no más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno); un peso molecular por debajo de 500 daltons; y un coeficiente de reparto octanol-agua log P de menos de 5.

A. Ligandos peptídicos

El diseño y la producción de ligandos peptídicos se describen en la solicitud de patente internacional publicada de los presentes inventores WO 2009/098450, así como las solicitudes de patente internacional WO 2004/077062 y WO 2006/078161. Los siguientes aspectos resumen la construcción de ligandos peptídicos.

(i) Andamiaje molecular

El andamiaje molecular se denomina a veces 'núcleo molecular' o 'compuesto conector'. Adecuadamente, el andamiaje molecular posee simetría molecular. Adecuadamente, el andamiaje molecular posee tres grupos reactivos de andamiaje y posee simetría triple. Esto tiene la ventaja de producir solamente un único producto de reacción. Si el andamiaje molecular no es una molécula simétrica, entonces se pueden producir múltiples productos de reacción. Esto puede conducir a complicaciones, o requerir que el isómero deseado se separe de los otros productos de reacción.

Adecuadamente, el andamiaje molecular puede ser una molécula pequeña. Adecuadamente, el andamiaje molecular es una molécula orgánica pequeña.

Adecuadamente, el andamiaje molecular puede ser, o se puede basar en, monómeros naturales tales como nucleósidos, azúcares o esteroides. Adecuadamente, el andamiaje molecular puede comprender un polímero corto de estas entidades, tal como un dímero o un trímero.

Adecuadamente, el andamiaje molecular puede comprender o puede consistir en tris(bromometil)benceno, especialmente 1,3,5-tris(bromometil)benceno ('TBMB'), o uno de sus derivados.

Otro andamiaje molecular adecuado es 2,4,6-tris(bromometil)mesitileno. Es similar al 1,3,5-tris(bromometil)benceno pero contiene adicionalmente tres grupos metilo empalmados al anillo bencénico. Esto tiene la ventaja de que los grupos metilo adicionales pueden formar contactos suplementarios con el polipéptido y de ahí añadir una constricción estructural adicional.

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

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

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

El andamiaje molecular de la invención contiene grupos químicos que permiten que los grupos funcionales del polipéptido de la biblioteca codificada de la invención formen ligazones covalentes con el andamiaje molecular. Dichos grupos químicos se seleccionan de una amplia gama 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

Los grupos reactivos de los polipéptidos codificados son proporcionados adecuadamente por las 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 se pueden seleccionar adecuadamente de grupos azida, ceto-carbonilo, alquino, vinilo o haluro de arilo. Los grupos reactivos de los polipéptidos codificados para ligazón a un andamiaje molecular pueden ser adecuadamente los extremos amino o carboxi del polipéptido.

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

Aminoácidos adecuados de los miembros de las bibliotecas químicas combinatorias genéticamente codificadas se pueden reemplazar por cualquier aminoácido natural o no natural. Se excluyen de estos aminoácidos intercambiables los que porten grupos funcionales para reticular los polipéptidos a un núcleo molecular. Un grupo de aminoácidos adyacentes que se puede variar se define como un segmento de polipéptido. El tamaño de un solo segmento de polipéptido varía adecuadamente de 1 a 20 aminoácidos. Los segmentos de polipéptido tienen bien secuencias aleatorias, bien secuencias constantes o bien secuencias con aminoácidos aleatorios y constantes. Los aminoácidos con grupos reactivos están situados en posiciones bien definidas o bien aleatorias dentro del polipéptido codificado de la invención.

En una realización, los segmentos de polipéptido que están unidos por dos aminoácidos que portan grupos reactivos para la unión con un andamiaje molecular/núcleo molecular son secuencias de aminoácidos cortas de 10 aminoácidos o menos. La reacción de dichas secuencias polipeptídicas codificadas con un núcleo molecular genera miembros de la biblioteca con alta constricción de conformación. Los ligandos con constricción de conformación son generalmente más específicos y tienen actividades de unión superiores.

(iii) Grupos reactivos del polipéptido

El andamiaje molecular de la invención se puede unir al polipéptido a través de grupos funcionales o reactivos sobre el polipéptido. Estos se forman típicamente a partir de las cadenas laterales de aminoácidos particulares encontrados en el polímero polipeptídico. Estos 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.

Adecuadamente, al menos un grupo reactivo es un grupo cisteína. Grupos tales como lisina o las aminas N-terminales típicamente no son suficientemente reactivos para unirse con el andamiaje molecular por sí mismos dentro de un espacio de tiempo conveniente. Sin embargo, una vez que el andamiaje molecular ha sido atraído o se ha unido a al menos una cisteína, entonces una cinética de reacción normal significa que los enlaces con lisina o amina se pueden formar a continuación rápidamente y establemente. Por esta razón, adecuadamente al menos uno de los grupos reactivos es un grupo cisteína.

Si se desean grupos reactivos sobre el polipéptido diferentes de grupos cisteína/lisina/amina, entonces se puede elegir un andamiaje molecular diferente a fin de aparearse con los grupos reactivos funcionales particulares de elección sobre el polipéptido diana.

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

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

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

- 5 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 el 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 una amplia gama de grupos reactivos, incluyendo un grupo azida, un ceto-carbonilo, un alquino, un vinilo o un haluro de arilo. El grupo amino y carboxilo de los extremos del polipéptido también pueden servir como grupos reactivos para formar enlaces covalentes con un andamiaje molecular/núcleo molecular.

- 10 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 usan, más segmentos de diversidad se pueden fijar al andamiaje molecular/núcleo molecular. Sin embargo, la ligazón de números excesivos de grupos reactivos a un andamiaje molecular/núcleo molecular no se recomienda ya que puede conducir a un número inmanejable de isómeros del producto. Adecuadamente, se usan tres, cuatro o cinco enlaces covalentes a un andamiaje molecular; lo más adecuadamente tres o cuatro enlaces covalentes; lo más adecuadamente tres enlaces covalentes.

B: Empalme de andamiajes a péptidos fágicos

- 20 Condiciones detalladas para el empalme de andamiajes a péptidos fágicos sin destruir la infectividad del fago se describen en la solicitud de patente internacional de los presentes inventores WO 2009/098450. El empalme de moléculas de andamiaje implica los siguientes principios.

- 25 En particular, se requiere la reducción de las cisteínas en el polipéptido diana para la reacción más eficaz. Posteriormente, el agente reductor usado para reducir químicamente esas cisteínas se retira habitualmente a fin de realizar el empalme deseado. Los grupos tiol de un polipéptido codificado en fago se pueden reducir con un agente reductor antes del empalme al andamiaje molecular. En estas realizaciones, en particular en realizaciones de presentación en fagos, o en particular cuando el agente reductor es TCEP, el exceso de agente reductor se retira adecuadamente mediante filtración, p. ej. filtración del fago.

Sin embargo, en algunas realizaciones, el agente reductor se puede retener en la reacción, por ejemplo en un nivel de 30 μM de TCEP.

- 30 La reoxidación de los grupos tiol después de la retirada de TCEP se evita adecuadamente mediante la desgasificación del tampón de reacción.

La reoxidación de los grupos tiol también se evita adecuadamente mediante la formación de complejos de iones metálicos mediante quelación, por ejemplo quelación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

- 35 Lo más adecuadamente, la reoxidación de los grupos tiol se evita o inhibe tanto mediante quelación como mediante el uso de tampones desgasificados.

En una realización de la presente invención, el empalme del polipéptido al andamiaje molecular se efectúa al hacer reaccionar los grupos reactivos del polipéptido tales como grupos tiol de un polipéptido codificado en fago con el andamiaje molecular durante una hora.

Adecuadamente, se hacen reaccionar a 30°C.

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

Adecuadamente, la reacción es en tampón acuoso.

Adecuadamente, la reacción es a pH 8.

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

Estas condiciones de reacción se optimizan para hacer reaccionar cuantitativamente grupos tiol de un polipéptido con los grupos reactivos del tris(bromometil)benceno. Bajo las mismas condiciones de reacción, aproximadamente 20% de las partículas de fago permanecen infectivas para llevar el código genético a células bacterianas para la propagación y la descodificación.

- 50 En una realización, el andamiaje molecular, tal como TBMB, puede estar empalmado al polipéptido diana, tal como un polipéptido codificado en fago, mediante la reacción (incubación) de grupos tiol del polipéptido durante una hora a 30°C con TBMB (es decir, tris(bromometil)benceno) 10 μM en presencia de TCEP 10 μM en tampón acuoso pH 8

que contiene 20% de acetonitrilo. En otra realización, la reacción se puede llevar a cabo usando TBMB 40 μ M en presencia de TCEP 30 μ M en el mismo tampón.

C: Ciclación de polipéptidos

Ciclación química

- 5 La invención también se refiere a ligandos peptídicos que tienen dos o más bucles, en los que el polipéptido del ligando se cicla para crear un bucle. Por ejemplo, se pueden crear polipéptidos tricíclicos enlazados a un andamiaje molecular al enlazar los extremos N y C de un polipéptido bicíclico enlazado a un andamiaje molecular según la presente invención. De este modo, los extremos N y C enlazados crean un tercer bucle, formando un polipéptido tricíclico. Adecuadamente, esta realización no se lleva a cabo sobre un fago, sino que adecuadamente se lleva a cabo sobre un ligando peptídico, esto es un conjugado de polipéptido-andamiaje molecular, de la invención. El enlace de los extremos N y C es un asunto habitual de la química de los péptidos. En caso de que sea necesaria alguna guía, el extremo C se puede activar y/o los extremos N y C se pueden extender, por ejemplo, para añadir una cisteína a cada terminación y a continuación empalmarlas mediante unión con disulfuro. Alternativamente, el enlace se puede realizar mediante el uso de una región ligadora incorporada en los extremos N/C. Alternativamente, los extremos N y C pueden estar enlazados por un enlace peptídico convencional. Alternativamente, se puede emplear cualquier otro medio adecuado para enlazar los extremos N y C, por ejemplo se podría realizar una ciclación N-C mediante técnicas estándar, por ejemplo según se divulga en Linde et al. *Peptide Science* 90, 671-682 (2008) "Structure-activity relationship and metabolic stability studies of backbone cyclization and N-methylation of melanocortin peptides", o como en Hess et al. *J. Med. Chem.* 51, 1026-1034 (2008) "backbone cyclic peptidomimetic melanocortin-4 receptor agonist as a novel orally administered drug lead for treating obesity".

- En general, los procedimientos para construir péptidos ciclados a partir de sus moléculas lineales se basan en principios conocidos de la síntesis de péptidos; lo más convenientemente, los procedimientos se pueden realizar según los principios conocidos de la síntesis de péptidos en fase sólida. Durante la síntesis en fase sólida de un polipéptido ciclado, un grupo de ligazón protegido se acopla al extremo N de la cadena peptídica o a la resina peptídica en un procedimiento similar al acoplamiento de otros aminoácidos. Después de la finalización del ensamblaje del polipéptido, el grupo protector se retira del grupo funcional del grupo de ligazón y la ciclación se efectúa al acoplar el grupo funcional del grupo de ligazón y un segundo grupo funcional seleccionado de un segundo grupo de ligazón, una cadena lateral de un residuo de aminoácido de la secuencia peptídica y un residuo de aminoácido N-terminal.

- El grupo de ligazón puede ser un aminoácido derivado en N^α o C^α, y preferiblemente comprende un átomo de nitrógeno del esqueleto peptídico conectado a un ligador químico que comprende una amida, un tioéter, un tioéster, un disulfuro, una urea, un carbamato o una sulfonamida, en donde al menos un grupo de ligazón está conectado a través de dicho grupo de puenteo para formar una estructura cíclica con un resto seleccionado del grupo que consiste en un segundo grupo de ligazón, la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la secuencia o un residuo de aminoácido terminal.

La metodología para producir grupos de ligazón se describe en las solicitudes de patente internacional publicadas como WO 95/33765 y WO 98/04583 y en las Pat. EE. UU. N° 5.770.687 y 5.883.293.

- Métodos para el diseño y la síntesis de polipéptidos ciclados se divulgan en las Pat. EE. UU. N° 5.811.392; 5.874.529; 5.883.293; 6.051.554; 6.117.974; 6.265.375, 6.355.613, 6.407.059, 6.512.092 y en las solicitudes internacionales WO 95/33765; WO 97/09344; WO 98/04583; WO 99/31121; WO 99/65508; WO 00/02898; WO 00/65467 y WO 02/062819.

- Si la ciclación no se lleva a cabo sobre un fago, se apuntará que este tercer bucle típicamente no estará disponible para la selección (debido a que no se produce sobre el fago sino solo sobre el conjugado polipéptido-andamiaje molecular) y así su uso para estas otras funciones biológicas deja todavía ventajosamente ambos bucles 1 y 2 para la selección/creación de especificidad. Así, la invención también se refiere a estos polipéptidos tricíclicos y su fabricación y usos.

Ciclación enzimática

- Según se divulga en los ejemplos, secuencias de aminoácidos se pueden ciclar cuantitativamente con una transglutaminasa microbiana (véase la Figura 1A). En la naturaleza, las transglutaminasas (TGasas) catalizan la reacción de transferencia de acilo entre los grupos carboxamida de la glutamina en péptidos y una variedad de aminas primarias. (Beninati, S. & Piacentini, M. *The transglutaminase family: an overview: minireview article. Amino acids* 26, 367-372 (2004)). La reacción, ampliamente observada en plantas, animales y microorganismos, conduce a la modificación postraducciona de proteínas a través bien de la formación de enlaces isopeptídicos o bien del empalme covalente de aminas. La actividad de ligación de las TGasas se ha explotado en la industria alimentaria mediante reticulación de proteínas y al unir compuestos de bajo peso molecular a proteínas portadoras usando transglutaminasa de mamífero procedente de cobayas o TGasa microbiana (Yokoyama, K., Nio, N. & Kikuchi, Y. *Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol* 64, 447-454 (2004)). Las TGasas también se han usado para el marcaje de proteínas con marcadores de molécula pequeña como por

ejemplo el empalme de biotina (Josten, A., Haalck, L., Spener, F. & Meusel, M. Use of microbial transglutaminase for the enzymatic biotinylation of antibodies. *J Immunol Methods* 240, 47-54 (2000)) o sondas fluorescentes (Mindt, T.L. et al. Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. *Bioconjug Chem* 19, 271-278 (2008)) a anticuerpos para aplicaciones inmunoquímicas. En otras palabras, las TGasas se han usado para la reticulación de proteínas (Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H. & Nagamune, T. Enzymatic labeling of a single chain variable fragment of an antibody with alkaline phosphatase by microbial transglutaminase. *Biotechnol Bioeng* 86, 399-404 (2004)). Sin embargo, para el conocimiento de los presentes inventores, la clase de TGasas no se ha usado hasta ahora para la ciclación de péptidos.

Aunque se ha encontrado en saliva humana que 1% del péptido natural estaterina se transforma mediante la acción de transglutaminasa 2 en un derivado cíclico (Cabras, T. et al. HPLC-MS characterization of cyclo-statherin Q-37, a specific cyclization product of human salivary statherin generated by transglutaminase 2. *J Sep Sci* 29, 2600-2608 (2006)), no estaba claro inicialmente si los péptidos con secuencias de aminoácidos y longitudes variables podrían ser ciclados eficazmente por TGasas. Según se muestra en los ejemplos, la TGasas microbiana puede ciclar cuantitativamente péptidos. También se describen los requisitos mínimos del sustrato. Por otra parte, los presentes inventores han usado la estrategia de ciclación enzimática con ligandos peptídicos bicíclicos para generar estructuras peptídicas tricíclicas.

D: Dianas

Los ligandos peptídicos según la presente invención se pueden diseñar para unirse a cualquier diana dada. Un experto en la técnica apreciará que la elección de la molécula diana es grande y variada. Pueden ser, a modo de ejemplo, proteínas, citocinas, receptores de citocinas, enzimas, cofactores para enzimas o proteínas que se unen a ADN, humanos o animales. Citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen pero no se limitan 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-1, insulina, IFN γ , 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 α , inhibina β , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, leptina, LIF, linfotactina, sustancia inhibidora mülleriana, 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 progenitor mielode-1 (MIPF-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- α , TGF- β , TGF-2, TGF-3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , 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- β , GRO- γ , HCC1,1-309, HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4; receptores de citocinas incluyen receptores para las citocinas precedentes. Dianas de quimiocina incluyen ligandos de quimiocina CC CCL21/6Ccina, 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/MIPF-2, CCL15/MIP-1 delta, tipo CCL26/tipo eotaxina-3, CCL9/10/MIP-1 gamma, CCL26/eotaxina-3, CCL19/MIP-3 beta, CCL11/eotaxina, CCL20/MIP-3 alfa, CCL14a/HCC-1, CCL23/MIPF-1, CCL14b/HCC-3, CCL18/PARC, CCL16/HCC-4, CCL5/RANTES, CCL1/I-309/TCA-3, TAFA1/FAM19A1, MCK-2, TAFA5/FAM19A5, CCL2/JE/MCP-1, TAFA3/FAM19A3, CCL8/MCP-2, TAFA4/FAM19A4, CCL7/MCP-3/MARC, CCL17/TARC, CCL13/MCP-4 y CCL25/TECK; receptores de quimiocinas incluyen CCR1, CCR7, CCR2, CCR8, CCR3, CCR9, CCR4, CCR10, CCR5, CCRL2/LCCR/CRAM-A/B y CCR6; ligandos de quimiocinas CXC incluyen CXCL13/BLC/BCA-1, CXCL10/IP-10/CRG-2, CXCL14/BRAX, LIX, CXCL16, CXCL15/lungcina, 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/quimiocina tímica-1 y CXCL8/IL-8; receptores de quimiocinas CXC incluyen CXCR3, CXCR7/RDC-1, CXCR4, CXCR1/IL-8 RA, CXCR5, CXCR2/IL-8 RB y CXCR6; ligandos de la superfamilia de TNF incluyen ligando 4-1BB/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 (pan), TNF-beta/TNFSF1B, EDA-A1/ectodisplasina A1, TRAIL/TNFSF10, EDA-A2, TRANCE/TNFSF11, ligando Fas/TNFSF6, TWEAK/TNFSF12 y ligando GITR/TNFSF18; receptores de la superfamilia de 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 tipo Toll incluyendo TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9; enzimas, incluyendo cathepsina A, cathepsina B, cathepsina C, cathepsina D, cathepsina E, cathepsina 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, urocinasa, 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 y factores. de transcripción intracelulares; p53; y MDM2.

Se apreciará que esta lista no es de ningún modo exhaustiva.

5 Las dianas también pueden ser proteínas plasmáticas grandes, tales como albúminas séricas, según se indica posteriormente.

Cuando el conjugado de polipéptido se une a dos epítopos (sobre dianas iguales o diferentes), las moléculas diana se pueden seleccionar de esta lista. Las dianas pueden competir con respecto a la unión al conjugado de polipéptido, de modo que no se puedan unir ambas simultáneamente. Alternativamente, ambas se pueden unir simultáneamente, de modo que el conjugado de polipéptido sirva de puente a las dianas.

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Péptidos cíclicos que se unen a dos o más dianas

15 El trabajo de Heinis et al., WO 2009/098450, demuestra el aislamiento de un péptido bicíclico (PK15) contra calicreína (PK15). PK15 se elaboró mediante un procedimiento en dos fases. Se creó un primer directorio bicíclico con diversidad en ambos bucles. Después de una selección iterativa con calicreína, surgía un conjunto de secuencias de consenso en el primer bucle, de las cuales PK2 era representativa. A continuación se creó un segundo directorio, manteniendo la secuencia de PK2 en el primer bucle y diversificando el segundo bucle. Después de una selección iterativa con calicreína, surgía un conjunto de secuencias de consenso en el segundo bucle. El procedimiento en dos fases conducía a una mejora en la afinidad de unión.

20 El surgimiento de secuencias de consenso en el primer bucle de PK2 sugiere que este bucle realiza una contribución significativa a la unión. No excluye la posibilidad de que el segundo bucle también realice una contribución significativa a la unión en PK2. En efecto, el surgimiento de una segunda secuencia de consenso del segundo bucle en PK15 sugiere que el segundo bucle no realiza una contribución significativa a la unión en PK15.

25 No obstante, los presentes inventores se preguntaron si sería posible construir un péptido bicíclico con especificidades de unión para dos dianas al combinar bucles individuales procedentes de péptidos bicíclicos de diferente especificidad. Aunque se espera observar una pérdida significativa en la afinidad de unión para cada diana, los presentes inventores consideraron que una mutagénesis adicional conduciría a variantes con afinidades de unión mejoradas. Los presentes inventores también evaluaron un péptido tricíclico formado por la fusión de los extremos N y C de la molécula bicíclica.

30 Según esto, se sintetizó en primer lugar un número de variantes del primer bucle de PK15 sobre el núcleo de TBMB del modo descrito previamente por Heinis et al. (2009), o la variación que se describe posteriormente. Para el compuesto tricíclico, se adoptó una etapa química adicional para enlazar el extremo N y C de un péptido bicíclico. Los péptidos bicíclicos se purificaron mediante HPLC, se comprobaron mediante espectrometría de masas y se secaron mediante liofilización. La tabla resume la IC₅₀ para la inhibición de la actividad de calicreína para cada péptido variante.

35 Para el otro bucle o bucles, además de secuencias derivadas de los inhibidores de calicreína bicíclicos, los presentes inventores también usaron secuencias derivadas de inhibidores de cathepsina G bicíclicos (también como se describe por Heinis et al. 2009. Nature Chemical Biology 5, 502-507) y de inhibidores bicíclicos contra MDM2, una enzima (una ubiquitina ligasa E3) que reconoce el dominio de activación trans de p53, el supresor tumoral, conduciendo a ubiquitinilación y degradación de p53 por el proteosoma. Un inhibidor de nutlina de la interacción p53-MDM2 puede conducir a activación *in vivo* de la ruta de p53, y se ha sugerido que estos agentes pueden tener potencial como agentes anticancerosos. Los presentes inventores seleccionaron dos péptidos bicíclicos (PEP10 y PEP48) contra MDM2; la afinidad de cada péptido sintético era micromolar o mejor. Se observó mediante ELISA de competición que el conjugado de PEP48 se unía al mismo sitio que un péptido lineal previamente conocido por bloquear la interacción p53-MDM2. Los protocolos para la selección de estos aglutinantes de MDM2 seguían generalmente los descritos previamente en Heinis et al., 2009, Nature Chemical Biology 5, 502-507, pero con algunas diferencias (principalmente incluían el uso de agente reductor durante las selecciones y/o la inclusión de una proteasa) y los protocolos se resumen en los Métodos posteriores.

50 El primer bucle de PK15 está subrayado en cada una de las variantes, y se combinaba con el primer bucle del péptido CG4 (doble subrayado) dirigido contra cathepsina G (Heinis et al, 1990), o el primer bucle de PEP48 (subrayado discontinuo) dirigido contra MDM2 (véase el documento WO 2009/098450).

Nombre del péptido	Secuencia del péptido	IC ₅₀
PK15L1-PK15L2 bicíclico	(H)-AC <u>SD</u> RFNRNCPADEALCG-(OH)	13 nM
X-CG4L1-PK15L1-Y bicíclico	(H)-ALC <u>I</u> FDL <u>G</u> FC <u>SD</u> RFNRNCPADE-(OH)	15 μM

CG4L1-PK15L1-PK15L2 tricíclico	(H)-ALCIFDLGFCSDRFRNCPADE-(OH)	15 μ M
PK15L1-CG4L1 bicíclico	(H)-ACSDRFRNCIFDLGFCG-(OH)	200 nM
PK15L1-PEP48L1 bicíclico	(H)-ACSDRFRNCVRFGWTCG-(OH)	11 μ M

Los resultados muestran que el primer bucle de PK15 es capaz de inhibir la actividad de calicreína cuando se combina con bucles procedentes de péptidos bicíclicos (o uno tricíclico) dirigidos contra una segunda diana. Sin embargo, la actividad inhibidora es mucho menor que cuando se combina con su bucle cognado, y varía según las secuencias y/o el orden de los bucles no cognados. En el caso del péptido tricíclico, la ciclación a partir del biciclo correspondiente no parece comprometer la actividad de unión a calicreína.

Los presentes inventores también obtuvieron resultados para la unión del primer bucle de PEP48 en combinación con PK15 (Fig. 6). Así, el péptido bicíclico PK15L1-PEP48L1 tiene una afinidad de unión ($K_d=1,55 \mu$ M) para MDM2 solo dos o tres veces inferior que la de todo el péptido bicíclico PEP48L1-PEP48L2 ($K_d = 500-800$ nM). Esto demuestra que es posible combinar bucles procedentes de dos péptidos cíclicos de diferente especificidad para diana, y de ese modo crear un péptido cíclico con las dos especificidades para diana.

Es posible mejorar las afinidades de unión de estos péptidos cíclicos, por ejemplo al (a) sintetizar un casete de ADN mutado que codifica los péptidos con oligonucleótidos "agregados", (b) presentar dicho directorio de péptidos mutantes sobre un fago y (c) someter a dicho directorio de fagos a rondas de selección bajo condiciones crecientemente rigurosas (por ejemplo usando concentraciones inferiores de antígeno, o lavados más intensivos del fago unido a la diana. Por otra parte, al seleccionar el directorio contra cada una de las dianas sucesivamente (con o sin rondas intermedias de crecimiento bacteriano, dependiendo de los rendimientos fágicos), debe ser posible asegurar que la presión de selección se mantenga sobre ambas dianas.

Métodos

Síntesis de conjugados de TBMB-péptido

Se realizaron reacciones iniciales para imitar las condiciones usadas durante la selección en fagos. Típicamente, se disolvieron 5 mg del péptido purificado en 1 ml de agua y se añadieron 0,8 ml de NH_4HCO_3 50 mM, seguido por 40 μ l de TCEP. Se añadió a la reacción TBMB (3 equivalentes basados en el peso de péptido) disuelto en MeCN. La reacción se dejó durante 1,5 h y a continuación se comprobó mediante HPLC. Al finalizar, la reacción se purificó mediante HPLC. Típicamente, se obtuvieron de 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. Esto 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 superior correspondientes a la adición de un segundo TBMB mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF, pero no se aislaron.

Basándose en la formación de aductos de TCEP, se desarrolló un método preferido. Después de la escisión del péptido desde la resina, bien se purificó directamente mediante HPLC o bien se pretrató con TCEP durante 15 minutos antes de la purificación por HPLC. El producto procedente de la reacción de HPLC, en el tampón de elución de HPLC (típicamente 6 ml), se neutraliza con NH_4HCO_3 50 mM (4 ml) y se añade TBMB en MeCN como anteriormente. La adición de 10% de THF da como resultado una solución transparente y por lo tanto acelera la reacción. Las reacciones se comprueban mediante espectrometría de masas, pero típicamente se finalizan en 1-2 h. Hay subproductos mínimos procedentes de esta reacción (aunque se observa la presencia de producto +16 mediante espectrometría de masas). La reacción requiere concentración para retirar disolventes orgánicos antes de la purificación por HPLC, de otro modo el producto tiende a eluirse con el frente de disolvente. Los rendimientos de producto a partir de este método son típicamente de 0,5 a 1,5 mg a partir de 3 mg de péptido, pero esto no se ha optimizado.

Síntesis de péptido tricíclico

El péptido tricíclico CG4L1-PK15L1-PK15-L2 se sintetizó como sigue: aproximadamente 1 mg del X-CG4L1-PK15L1-Y bicíclico (donde X e Y representan porciones de PK15L2) se disolvió en 2 ml de NH_4HCO_3 20 mM y se trató con EDC (0,8 mg en 100 μ l de agua, 10 equivalentes) y se calentó en un sintetizador de microondas a 50 W partiendo de 0°C hasta 37°C. El avance de la reacción se comprobó a los 15 minutos y 30 minutos cuando el producto ciclado era el producto principal pero también se observaba una segunda pérdida de agua. La reacción se purificó mediante HPLC (semipreparativa) para dar el conjugado tricíclico como un solo pico, rendimiento 0,5 mg.

Ensayos de calicreína

Las enzimas se adquirieron de Sigma Aldrich y los sustratos de Bachem AG. El tampón de ensayo está compuesto por Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 10 mM, CaCl_2 1 mM, BSA al 0,1%, Triton X100 al 0,01% y DMSO al 5%. Las enzimas se incubaron con inhibidores durante 30 minutos a TA antes de la adición de 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 calicreína se compró como una solución de 1080 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 de reserva 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 de reserva de 60 µM. Se introdujeron 50 µl de cada reactivo en pocillos para un volumen final de 150 µl por pocillo. La concentración final de calicreína en el ensayo es 0,1 nM y el sustrato es 100 µM.

Las concentraciones finales de inhibidores eran: 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 al representar la fluorescencia = datos de f (tiempo) y al ajustar una tendencia lineal para cada concentración de inhibidor. Las curvas de inhibición se obtienen al representar la velocidad inicial = f ([I]) y se pueden evaluar los valores de IC₅₀.

Producción y purificación de fagos

Para las selecciones contra MDM2, la biblioteca de péptidos en fagos con diversidad de al menos 4x10⁹ clones se preparó y se conjugó a TBMB según se describe previamente por Heinis et al., 2009 Nature Chemical Biology 5, 502-507, con unas pocas modificaciones.

1. La biblioteca de cx6 de fago de Heinis et al., 2009 Nature Chemical Biology 5, 502-507, (que se había preparado a partir de células TG1) se usó para infectar la cepa no supresora HB2151 (Carter, Bedouelle & Winter. 1985. Nucleic acids Res. 13:4431-43), y las células infectadas se sembraron en placas. Las bacterias se rascaron de las placas en aproximadamente 8 ml de medio 2xTY, 30 ug/ml cloranfenicol, glicerol al 10% (v/v).

2. Se añadieron aproximadamente 0,8 ml de la solución de reserva 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 16 horas.

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

4. La mezcla de sobrenadante/fago precipitada se centrifugó durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se descartó.

5. El fago se resuspendió en 35 ml de PBS, EDTA 5 mM, seguido por centrifugación durante 15 min. a 4000 rpm (Heraeus Megafuge 2R) para retirar residuos celulares. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de Falcon de 50 ml.

Modificación de fago con TBMB

1. Se añadieron 5 ml de TCEP 8 mM (en H₂O) al fago para obtener una concentración final 1 mM de TCEP. El tubo se invirtió varias veces para mezclar y se incubó durante 1 h en un baño de agua de 42°C.

2. El TCEP se retiró mediante una segunda precipitación con PEG. Se añadieron 10 ml de PEG al 20%, NaCl 2,5 M (solución desgasificada), se mezcló y se incubó sobre hielo durante 45 min. y se centrifugó durante 30 min. a 4000 rpm, 4°C.

3. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y la pella se resuspendió en 12 ml de PBS, EDTA 5 mM, TCEP 10 uM (tampón desgasificado)

4. Se añadieron 3 ml de TBMB 50 uM en acetonitrilo a los 12 ml de fago reducido para obtener una concentración de TBMB final de 10 uM. El tubo se invirtió varias veces y se dejó a 30°C durante 1 h en un baño de agua. El fago se enfrió sobre hielo y se precipitó con 1/5 de volumen de PEG al 20%, NaCl 2,5 M durante 30 min. El fago se recogió al centrifugar a 4000 rpm (Heraeus Megafuge 2R) durante 20 min. El sobrenadante se retiró y el fago se resuspendió en 4 ml de PBS. El fago se transfirió a los tubos de Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 13000 rpm (centrífuga de mesa de Eppendorf) durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf y se midió la infectividad del fago.

Selección de fagos: protocolo general

Primera ronda de selección

1. Un fago purificado y conjugado químicamente como anteriormente se seleccionó contra péptido MDM2 (bio-MDM2) (res 2-125) inmovilizado sobre la superficie de las Dynabeads (DynaL Biotech) revestidas con estreptavidina. En primer lugar, 80 µl de cuentas se lavaron y bloquearon con 2% (p/v) de leche en polvo

Marvell en PBS (PBSM) durante 40 min seguido por incubación con bio-MDM2 100 nM durante 20 min en un volumen total de 1 ml.

2. El fago químicamente modificado (10^{10} - 10^{11} TU) se incubó con PBSM durante 40 min.
- 5 3. Cuentas revestidas con Ag bloqueadas procedentes de la etapa 1 se lavaron del exceso de la Ag con Tween al 0,1% en PBS (PBST) y se incubaron con el fago bloqueado durante 30 min en un volumen total de 1 ml.
4. El fago no unido se lavó con 10x con PBST seguido por 2x con PBS. Después de cada tercera etapa de lavado, las cuentas revestidas con fago se transfirieron a un nuevo tubo de Eppendorf.
5. Los fagos se eluyeron al incubar con 500 µl de glicina 50 mM pH 2,2 durante 10 min sobre una rueda giratoria. Los fagos eluidos se neutralizaron con 250 µl de Tris 1 M, pH 7,5.
- 10 6. Se incubaron 375 µl de fago con 10 ml de células HB2151 durante 90 min a 37°C sin agitación.
7. A continuación, las células infectadas se agitaron durante 30 min a 37°C y a continuación se sembraron sobre una placa de cloranfenicol (20x20 cm).
8. Las colonias se rascaron de la placa en 2xTY, cloranfenicol, glicerol al 10% según se describe anteriormente, y se almacenaron como una solución de reserva de glicerol a -80°C. Una fracción de las células se usó para preparar el fago para una segunda ronda de selección.
- 15

Segunda ronda de selección

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

1. Se usaron cuentas magnéticas revestidas con neutravidina en lugar de las de estreptavidina.
2. La cantidad de antígeno usada en la selección era 20 nM.
- 20 3. El fago químicamente modificado (10^{10} - 5×10^{10} TU) se trató en primer lugar con 50 µg/ml de quimotripsina durante 2 min seguido por bloqueo con PBSM durante 40 min.
4. El fago no unido se lavó con 15x con PBST seguido por 2x con PBS, por lo demás como anteriormente.

Selección de fagos: protocolo variante

25 El clon 48 se seleccionó usando el protocolo general como anteriormente, mientras que el clon 10 se desarrolló como resultado de un protocolo modificado que se introducía. Las modificaciones son las siguientes:

1. En la primera ronda, los fagos químicamente modificados se trataron con 50 µg/ml de quimotripsina durante 2 min seguido por bloqueo con PBSM durante 40 min.
2. En la segunda ronda, los fagos químicamente modificados se redujeron en primer lugar con DTT 5 mM durante 20 min seguido por incubación con 50 µg/ml de quimotripsina durante 2 min y bloqueo con PBSM durante 40 min.
- 30

Síntesis de péptidos

Los péptidos codificados procedentes del clon 48 del fago y el clon 10 del fago se sintetizaron con los 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 La síntesis se realizó mediante síntesis del Fmoc-péptido en un sintetizador de péptidos de microondas CEM Liberty sobre 0,1 mmol de resina de Fmoc-Gly-PEG de PS usando un exceso de 5 veces de Fmoc-aminoácidos activados con PyBop en DMF y DIPEA en NMP (1 equivalente y 2 equivalentes, respectivamente. Los grupos protectores de la cadena lateral eran como sigue: Arg(Pbf); Asn(Trt); Asp(OtBu); Cys(Trt); Glu(OtBu); Lys(Boc); Ser(tBu); Thr(tBu); Trp(Boc). La desprotección de Fmoc se llevó a cabo usando piperidina al 20% v/v/DMF que contenía HOBt 0,1 M.
- 40 Las H-peptidil-resinas se lavaron con DMF, a continuación propan-2-ol y se secaron a vacío. La escisión de grupos protectores de la cadena lateral y desde el soporte se efectuó usando TFA/EDT/H₂O/iPr₃SiH 94:2,5:2,5:1 v/v/v/v durante 2 horas. La mezcla de péptido/TFA se filtró para retirar el soporte y la mezcla de péptido/TFA se diluyó con agua y se lavó con Et₂O (5 veces) y la capa acuosa se liofilizó.

- 45 Se realizó hplc en fase inversa en una columna Phenomenex Jupiter 5µ C18 300Å de 250x4,6 mm. Tampón A: TFA al 0,1%/H₂O; Tampón B: CH₃CN que contiene 10% de Tampón A. La columna se eluyó isocráticamente con 10% de Tampón B durante 2 minutos, y a continuación con un gradiente lineal de 10-90% a lo largo de 25 minutos. La detección era a 215/230 nm; caudal de 1,5 ml/min.

Los péptidos se liofilizaron y se comprobaron mediante espectrometría de masas. Masa por MALDI-TOF de PEP10

(M+H): 2099,9 Da (Teoría: 2098,4 Da.) Masa por MALDI-TOF de PEP48 (M+H): 2043,8 Da (Teoría: 2042,8 Da.). Los péptidos se conjugaron con TBMB según se describe en el Ejemplo 2.

Ensayos de unión

Ensayo ELISA de fagos

- 5 Se inmovilizaron 0,6 µg/ml de péptido MDM2 biotinilado (res 2-125) sobre una placa revestida con estreptavidina (Roche). La placa se bloqueó con PBSM (pero 4% en leche en polvo) y fago lineal o conjugado a TBMB (10^7 TU/pocillo en PBSM en presencia o ausencia de DTT 5 mM) se incubó sobre la placa durante 50 min a temperatura ambiente. De forma similar, el fago se redujo en primer lugar en DTT 5 mM durante 20 min, se trató con quimotripsina (50 µg/ml en PBS) durante 2 min, se mezcló con PBSM (concentración final) y se incubó sobre la
- 10 placa durante 50 min a temperatura ambiente. El fago se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-M13-HRP (1:5000, Amersham).

Medidas de anisotropía de fluorescencia

- 15 Se realizaron experimentos de valoración en un fluorímetro Jobin Yvon de Horiba equipado con el valorador Microlab de Hamilton controlado por un programa de laboratorio. Las λ_{ex} y λ_{em} usadas eran 295 nm y 350 nm, respectivamente. Las anchuras de las ranuras para la excitación y la emisión eran 5 nm y 15 nm y se usó el tiempo de integración 10 s 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 realizaron a 23°C en PBS, DTT 5 mM. Habitualmente, se valoraban 250 µl de MDM2 (150 µM) en 1,2 ml de péptido (1 µM). Los datos de valoración se analizaron con un modelo de unión 1:1 estándar al usar la solución cuadrática hasta el equilibrio $K_d = [A][B]/[AB]$. K_d es la velocidad de disociación, y [A] y [B] se refieren a la concentración de un valorador (MDM2) y los péptidos fluorescentes 10 y 48, respectivamente. La ecuación de ajuste contenía un término adicional para tener en cuenta la deriva lineal.
- 20

Los resultados (Fig. 6 y posteriormente) indican que la afinidad de cada péptido es submicromolar, y en el intervalo 250-750 nM. Las medidas se repitieron para PEP48.

- 25 PEP10+MDM2, λ_{ex} medida=295 nm, K_d =267 nM;
 PEP48+MDM2, λ_{ex} medida=280 nm, K_d =760 nM;
 PEP48+MDM2, λ_{ex} medida=295 nm, K_d =567 nM

Ensayos de competición

- 30 La unión del fago PEP48 a MDM2 se hizo competir mediante un péptido pMI (TSFAEYWNLLSP) que se une a MDM2 en el sitio p53 con una $K_d = 3,3$ nM (Pazgier et. al., 2009 PNAS, 106, 4665-4670). Se inmovilizaron 0,6 µg/ml de péptido MDM2 biotinilado (res 2-125) sobre una placa revestida con estreptavidina (Roche). La placa se bloqueó con PBSM. El fago conjugado a TBMB (10^7 TU/pocillo en PBSM al 1%) se premezcló con una gama de concentraciones de pDI (de 6,94 nM a 1 µM) y se incubó sobre la placa durante 75 min a temperatura ambiente. El fago se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-M13-HRP (1:5000, Amersham). La unión del fago PEP48 a
- 35 MDM2 se inhibió mediante la adición del péptido pMI, con una IC50 estimada = 125 nM.

Ejemplo 2: Ciclación enzimática

Metodología

Síntesis de péptidos

- 40 Los péptidos 1-6 y PK15 con extremos N libres y extremos C amidados se sintetizaron a una escala de 0,05 mmol con química de Fmoc estándar en un sintetizador de péptidos automatizado (Advanced ChemTech 348Ω). Después de la escisión desde la 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxirresina de Rink con ácido trifluoroacético (95%), triisopropilsilano (2,5%) y H₂O (2,5%), los péptidos se precipitaron dos veces en éter dietílico refrigerado y los péptidos secados se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa en una columna Vydac 218TP1022 C18 (22x250 mm) (Hesperia, EE. UU. de A.) con una elución en
- 45 gradiente con una fase móvil compuesta por ACN y solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% a un caudal de 20 ml/min. Los péptidos se liofilizaron y se disolvieron en Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 y NaCl 100 mM. Los péptidos 7 y 8 con extremos N libres y extremos C amidados se sintetizaron a una escala de 25 mg mediante química en fase sólida (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania).

Ciclación de péptidos

- 50 Los péptidos 1-6 (1 µM - 1 mM) en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y NaCl 10 mM se probaron con respecto a la ciclación mediante incubación con transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobaraensis* (38 kDa) (Zedira, Darmstadt, Alemania) (30 nM - 6 µM) durante 5 horas a TA. Los péptidos 7 y 8 se hicieron reaccionar con tris-

(bromometil)benceno (TBMB) mediante incubación de péptido 800 μM con TBMB 1 mM en 5 ml de NH_4HCO_3 (100 mM, pH 8) al 66,5% (v/v) y acetonitrilo al 28,5% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% durante 1 hora a 30°C y se purificaron mediante HPLC. Los péptidos bicíclicos 7 y 8 purificados por HPLC (150 μM) en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y NaCl 10 mM se incubaron con MTGasa (1,5 μM) durante 6 horas a TA. El péptido PK15 se conjugó con TBMB según se describe previamente (Heinis, C., Rutherford, T., Freund, S. & Winter, G. Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. Nat Chem Biol (2009)).

Análisis espectrométrico de masas de péptidos

La masa de los péptidos se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Axima-CFR plus, Kratos, Manchester, Reino Unido) como sigue. Los péptidos en TFA al 0,1%/acetonitrilo al 10-30% en agua o tampón de reacción de MTGasa (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y NaCl 10 mM) se mezclaron con el mismo volumen de solución de matriz (10 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (a-CHCA) en 1 ml de acetonitrilo al 50%/H₂O al 50%/TFA al 0,1%) y se realizaron medidas de masa. El grado de conversión de los péptidos 3 y 4 en los productos cíclicos se cuantificó mediante LC-MS (micromass ZQ 4000, Waters, Milford, EE. UU. de A.). Las reacciones (20 μl) se mezclaron con 80 μl de ácido fórmico al 0,1% y TFA al 0,02% en agua y se separaron 50 μl mediante cromatografía en fase inversa en una columna Vydac 218TP54 C18 (4,6x250 mm) (Hesperia, EE. UU. de A.) y se sometieron a análisis de masa. La cuantificación se realizó mediante la extracción del cromatograma iónico (EIC) y mediante la integración de los picos. Los resultados se confirmaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Greis, K.D. et al. MALDI-TOF MS as a label-free approach to rapid inhibitor screening. J Am Soc Mass Spectrom 17, 815-822 (2006)). La desamidación de glutamina hasta residuo de glutamato en el péptido 6 se analizó mediante espectrometría de masas en tándem (MS-MS) (micromass Q-ToF Ultima™, Waters, Milford, EE. UU. de A.).

Tratamiento de BSA con MTGasa

Se incubaron 5 μg de albúmina sérica bovina (68 kDa) adquirida de Applichem (Darmstadt, Alemania) en 20 μl de tampón de reacción de MTGasa (correspondiente a una concentración de BSA de 3,7 μM) con MTGasa (concentraciones que variaban de 60 nM a 6 μM) durante 5 horas a TA. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE.

Ensayos de actividad

Las actividades inhibitorias (IC_{50}) de los péptidos bicíclicos y tricíclicos 7 y 8 así como el péptido bicíclico PK15 se determinaron al incubar caliceína plasmática humana (0,1 nM; Innovative Research, Southfield, EE. UU. de A.) en Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl_2 10 mM, CaCl_2 1 mM, BSA al 0,1%, triton X-100 al 0,01% y DMSO al 5% con los péptidos a diferentes concentraciones (que varían de 2,5 μM a 0,1 nM) y medir las actividades residuales de caliceína plasmática con el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-AMC (100 μM) a TA. Las intensidades de fluorescencia se registraron durante 1 hora con longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm en un lector de placas de fluorescencia (Molecular Devices, Sunnyvale, EE. UU. de A.).

Tratamiento de péptidos con aminopeptidasa

El péptido 7 antes (300 μM) y después (75 μM) del tratamiento con MTGasa en tampón de reacción se incubó con diferentes cantidades de leucil aminopeptidasa procedente de *Aeromonas proteolytica* (EC 3.4.11.10; Sigma, A8200) (de 3 a 352 ng, correspondientes a concentraciones de aproximadamente 50 nM a 6 μM) en un volumen final de 2 μl durante 30 min a TA. La masa de los péptidos se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Ciclación cuantitativa de péptidos con transglutaminasa microbiana

Los presentes inventores usaron la transglutaminasa microbiana (MTGasa) de 38 kDa de *Streptomyces mobaraensis* para probar la ciclación enzimática de péptidos (Yokoyama, K., Nio, N. & Kikuchi, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol 64, 447-454 (2004)). Se presentaba que la MTGasa era relativamente estable en aplicaciones de procesamiento de alimentos y otras y en contraste con TGasas de mamífero es activa en ausencia de Ca^{2+} . Las selecciones de fagos con bibliotecas de heptapéptidos aleatorias habían revelado que la MTGasa de *Streptomyces mobaraensis* acepta una amplia gama de sustratos en donde ciertos péptidos se prefieren como sustratos donantes de glutamina (Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. & Hitomi, K. Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. Arch Biochem Biophys 477, 379-383 (2008)). Los presentes inventores diseñaron un péptido con la secuencia del sustrato de MTGasa WALQRPH (el residuo donante de glutamina está subrayado; Sugimura et al., 2008), un espaciador de tres aminoácidos flexible (GGG) y un residuo aceptor de lisina (péptido 1, H-WALQRPHGGGKS-NH₂; **Tabla 1**). Los presentes inventores eligieron colocar el péptido de sustrato donante de glutamina (WALQRPH) en el extremo N y el residuo de lisina en el extremo C del péptido debido a que un modelo de un complejo de péptido-MTGasa sugería que solo en esta configuración el ligador peptídico podía curvarse hacia atrás para aproximar mucho las cadenas laterales de la lisina y la glutamina. La incubación del péptido 1 (3,8 μM) con MTGasa (30 nM) y el análisis espectrométrico de masas revelaban un solo producto con una masa menor de 17 Da sugiriendo que se eliminaba una molécula de amonio y el péptido se ciclaba (**Figura 1B**). A concentraciones de péptido superiores, se observaba la formación de dímeros.

Especificidad del sustrato de MTGasa en reacciones de ciclación

A fin de determinar la secuencia de aminoácidos mínima que es aceptada por MTGasa como un sustrato en una reacción de ciclación, los presentes inventores sintetizaron una gama de péptidos en la que la secuencia del sustrato donante de glutamina de MTGasa WALQRPH estaba truncada (**Tabla 1**) y midieron el grado de ciclación tras la incubación con MTGasa. Aunque un péptido sin los tres aminoácidos N-terminales Trp-Ala-Leu (péptido 2; H-GQRPHGGGKS-NH₂) no se ciclaba en absoluto, la sustitución de los tres aminoácidos Arg-Pro-His por residuos de Ser-Gly-Ser daba un sustrato (péptido 3, H-WALQSGSGGGKS-NH₂) que se ciclaba cuantitativamente. Este resultado era halagüeño ya que sugería que se pueden generar péptidos cíclicos con secuencias variables en el anillo en reacciones catalizadas con MTGasa. Los experimentos con péptidos parcialmente truncados en el extremo N revelaban que un péptido con Ala-Leu en el lado N-terminal del residuo de glutamina se cicla (péptido 4, H-ALQSGSGGGKS-NH₂) pero no un péptido más corto (péptido 5, H-LQSGSGGGKS-NH₂) (**Tabla 1**). El requisito de una secuencia relativamente pequeña de la MTGasa determinado en este conjunto de experimentos debe permitir la generación de péptidos cíclicos que no estén muy comprometidos en su diseño.

Actividad catalítica de MTGasa en reacciones de ciclación

A fin de cuantificar la actividad catalítica de MTGasa en reacciones de ciclación, los presentes inventores incubaron los dos péptidos de sustrato 3 (H-WALQSGSGGGKS-NH₂) y 4 (H-ALQSGSGGGKS-NH₂) (90 µM) con diferentes concentraciones de enzima (1 nM a 6 µM) y cuantificaron el grado de ciclación mediante LC-MS y MALDI-TOF MS²² (**Figura 2A**). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 horas, los péptidos 3 y 4 se ciclaron cuantitativamente a concentraciones de MTGasa de 60 nM y 1,5 µM, respectivamente. El péptido 4 que tenía una secuencia del sustrato donante de glutamina más corta se ciclaba mediante MTGasa alrededor de 5 veces más lentamente que el péptido 3. Para determinar la ligación inespecífica de residuos de glutamina y lisina, los presentes inventores incubaron 5 µg de albúmina sérica bovina (BSA) con las mismas concentraciones de MTGasa (de 60 nM a 6 µM) y analizaron el grado de reticulación de proteína mediante SDS PAGE. Aunque la BSA tiene 7 y 30 residuos de glutamina y lisina accesibles al disolvente correspondientes a concentraciones tan altas como 28 y 120 µM, no se observaba reticulación inespecífica de proteína (**Figura 2B**), sugiriendo que el péptido también se puede ciclar en presencia de proteínas o incluso mezclas de proteínas (p. ej. en el citoplasma de una célula de mamífero o bacteriana).

Desaminación de glutamina catalizada por MTGasa

En un experimento de control, los presentes inventores habían incubado un péptido con un residuo aceptor de lisina en el extremo C (péptido 6, H-WALQSGSGGGGS-NH₂; **Tabla 1**) (de 28 a 280 µM) con MTGasa (6 µM) esperando que no se cicla. Inesperadamente, el análisis por MALDI-TOF mostraba reproduciblemente un producto con una masa de 1062 Da que es 1 dalton más largo que la masa del péptido 6 (1061 Da) antes del tratamiento con MTGasa (**Figura 3B**). Este cambio de masa se espera para una reacción de desamidación en la que el residuo de glutamina del péptido 6 sea atacado por el tiol del sitio activo de MTGasa y el producto intermedio se hidrolice y se forme un residuo de glutamato (**Figura 3A**). La transformación de glutamina en glutamato se confirmó mediante la secuenciación del producto de reacción usando espectrometría de masas en tándem (resultados no mostrados). No se detectaba la desamidación de los residuos de glutamina en los péptidos 1-5, sugiriendo que la ciclación a través de transamidación es mucho más rápida y que la desamidación ocurre solamente si no hay una amina primaria disponible.

Generación de péptidos tricíclicos

Posteriormente, los presentes inventores probaron si una reacción de ciclación química que se usaba previamente para generar péptidos bicíclicos (Heinis, C., Rutherford, T., Freund, S. & Winter, G. Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. *Nat Chem Biol* (2009); Timmerman, P., Beld, J., Puijk, W.C. & Melen, R.H. Rapid and quantitative cyclization of multiple peptide loops onto synthetic scaffolds for structural mimicry of protein surfaces. *Chembiochem* 6, 821-824 (2005)), se puede combinar con la ciclación enzimática para obtener un péptido tricíclico (**Figura 4A**). Los presentes inventores sintetizaron el inhibidor de péptido bicíclico de calicreína plasmática humana PK15 (Heinis et al., 2009) con los apéndices del péptido exocíclico Ala-Leu-Gln-Ala en los extremos N y Ala-Lys-Ser en los extremos C al hacer reaccionar el péptido lineal 7 (H-ALQACSDRFRNCPADEALCAKS-NH₂; **Tabla 1**) a través de las tres cadenas laterales de cisteína con el compuesto orgánico pequeño tris-(bromometil)benzeno. La incubación del péptido bicíclico con MTGasa daba un solo producto con una masa de 2464 Da que es 17 daltons menor que el péptido bicíclico, sugiriendo que los dos extremos se ligaban en una reacción de transamidación (**Figuras 4B y 4C**). Un experimento idéntico con un péptido que tiene un residuo de triptófano adicional en el extremo N (péptido 8, H-WALQACSDRFRNCPADEALCAKS-NH₂; **Tabla 1**) daba un resultado equivalente. Para confirmar la ciclación del tercer bucle, el péptido tricíclico 7 se trató con la leucil aminopeptidasa procedente de *Aeromonas proteolytica* (EC 3.4.11.10) que escinde aminoácidos del extremo N de cadenas peptídicas muy accesibles. El análisis espectrométrico de masas de los productos de reacción mostraba que el residuo de glutamina no conjugado en el péptido bicíclico se degradaba junto con los otros aminoácidos exocíclicos (Ala-Leu-Gln-Ala) si se añadían 70 ng o más de exopeptidasa (**Figura 5A**). En contraste, se requerían concentraciones superiores de exopeptidasa para degradar el dipéptido Gln-Ala en el péptido tricíclico donde la cadena lateral de glutamina está ligada a lisina (**Figura 5B**). Junto con el cambio de masa observado de 17 daltons

tras la incubación del péptido bicíclico con MTGasa, estos resultados apoyaban la configuración del péptido tricíclico mostrada en la **Figura 4B**. Los péptidos tricíclicos 7 y 8 inhibían calicreína plasmática humana aproximadamente 70 veces más débilmente (IC_{50} de 200 nM y 196 nM) que el inhibidor original PK15 (IC_{50} = 3 nM) (**Tabla 2**). La medida de las actividades de los péptidos 7 y 8 como estructuras bicíclicas (antes de la ciclación con MTGasa; IC_{50} de 259 nM y 185 nM) revelaba que la caída de actividad se debe a los apéndices del péptido y no debido a la formación del tercer bucle peptídico (**Tabla 2**). Este resultado está en línea con el hallazgo de que la conjugación C-terminal de PK15 a una proteína reduce su actividad en un factor de alrededor de 10 (Heinis et al., 2009).

Tablas

Tabla 1

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Ciclación con MTGasa	Masa (Da)
péptido 1	H-WAL <u>Q</u> RP <u>H</u> GGG <u>K</u> S-NH ₂	Sí	1291,68
péptido 2	H-G <u>Q</u> RP <u>H</u> GGG <u>K</u> S-NH ₂	No	978,50
péptido 3	H-WAL <u>Q</u> SGSGGG <u>K</u> S-NH ₂	Sí	1132,55
péptido 4	H-AL <u>Q</u> SGSGGG <u>K</u> S-NH ₂	Sí	946,47
péptido 5	H-L <u>Q</u> SGSGGG <u>K</u> S-NH ₂	No	875,44
péptido 6	H-WAL <u>Q</u> SGSGGGGS-NH ₂	No	1061,48
péptido 7	H-AL <u>Q</u> ACSDRFRNCPADEAL <u>C</u> AKS-NH ₂	Sí	2481,08
péptido 8	H-WAL <u>Q</u> ACSDRFRNCPADEAL <u>C</u> AKS-NH ₂	Sí	2667,16

Tabla 2

Nombre	Secuencia de aminoácidos	IC_{50} (nM)	
		Antes de la ciclación con MTGasa (bicíclico)	Después de la ciclación con MTGasa (tricíclico)
PK15	H-ACSDRFRNCPADEAL <u>C</u> G-NH ₂	3	-
péptido 7	H-AL <u>Q</u> ACSDRFRNCPADEAL <u>C</u> AKS-NH ₂	259	200
péptido 8	H-WAL <u>Q</u> ACSDRFRNCPADEAL <u>C</u> AKS-NH ₂	185	196

Tabla 2. Inhibición de calicreína plasmática humana con péptidos bicíclicos y tricíclicos. Se indican las secuencias de aminoácidos de PK15,⁴ péptido 7 y 8 y sus actividades inhibitoras antes (como conjugados con TBMB bicíclicos) y después del tratamiento con MTGasa (péptidos tricíclicos).

REIVINDICACIONES

1. Un directorio de ligandos peptídicos que se presenta usando un sistema de presentación genética, en donde cada ligando peptídico comprende una variante polipeptídica ligada a un andamiaje molecular en n puntos de empalme, en donde dicho polipéptido está ciclado y forma n bucles separados subtendidos entre dichos n puntos de empalme sobre el andamiaje molecular, en donde n bucles separados = n puntos de empalme y n es 2 o 3, y dicho andamiaje molecular posee n grupos reactivos de andamiaje y una simetría molecular de n veces.
5
2. Un directorio según la reivindicación 1, en donde el polipéptido se cicla después del empalme al andamiaje molecular.
3. Un directorio según cualquier reivindicación precedente, en donde el polipéptido se cicla por medios enzimáticos, por ejemplo en donde la enzima es una transglutaminasa, por ejemplo transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis*.
10
4. Un directorio según cualquier reivindicación precedente, que es capaz de unirse a más de una diana separada.
5. Un directorio según la reivindicación 4, en donde el bucle formado por la ciclación del polipéptido se une a una diana que es diferente a la unida con al menos otro bucle.
15

Figura 1

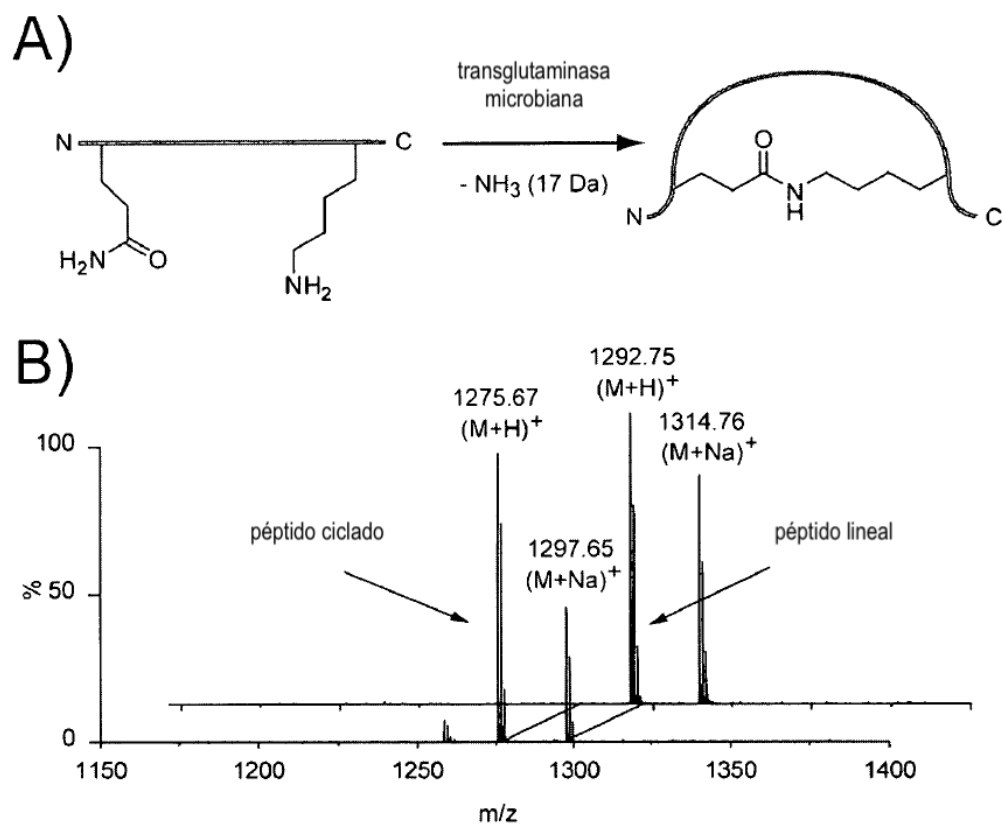


Figura 2

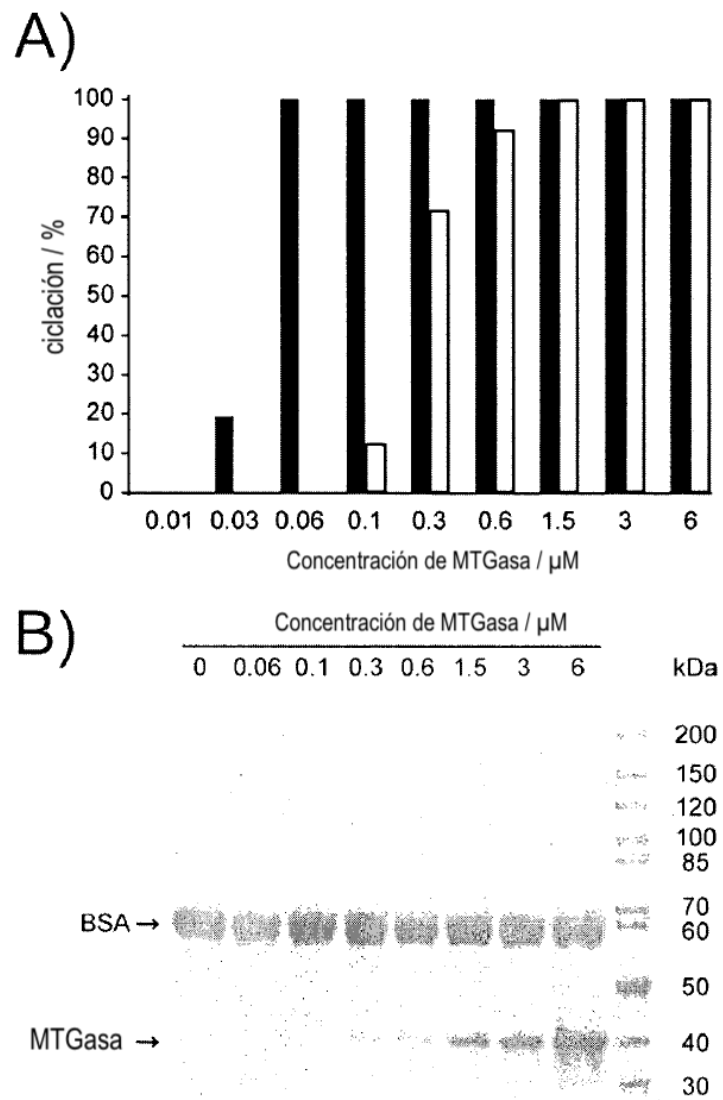


Figura 3

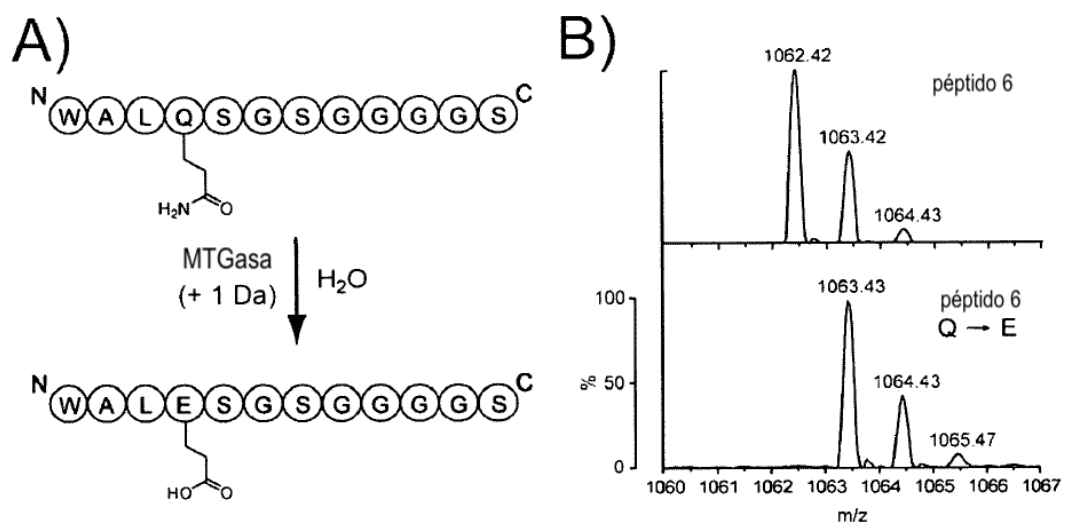


Figura 4

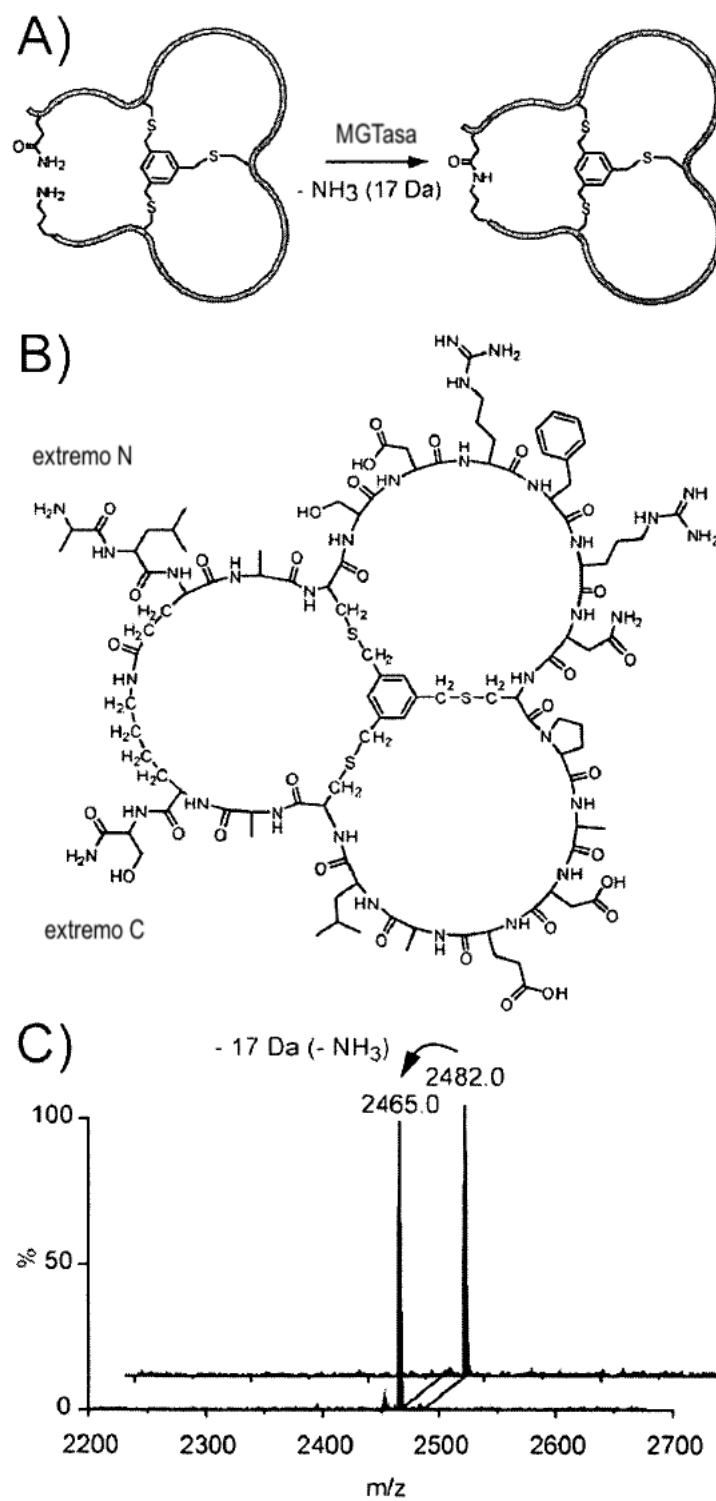
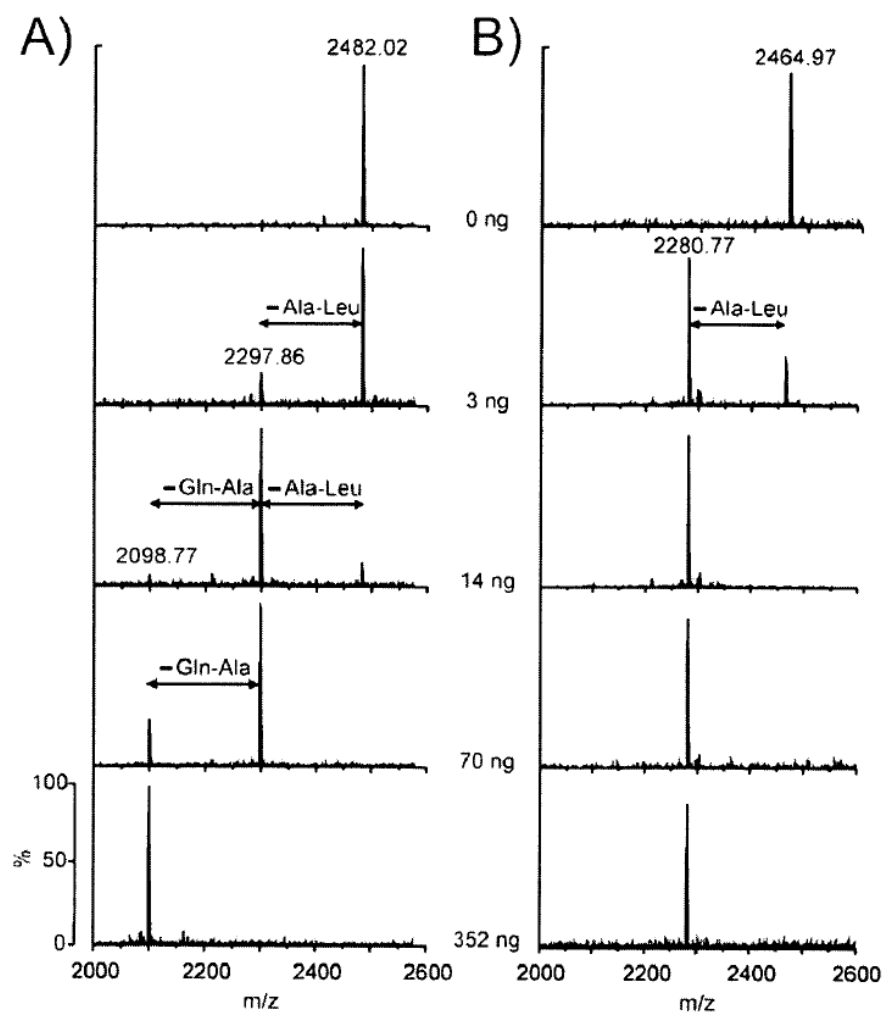


Figura 5



Péptido doblemente específico PK15 (L1)_pep48 (L1) que se une a MDM2 (res 2-125)

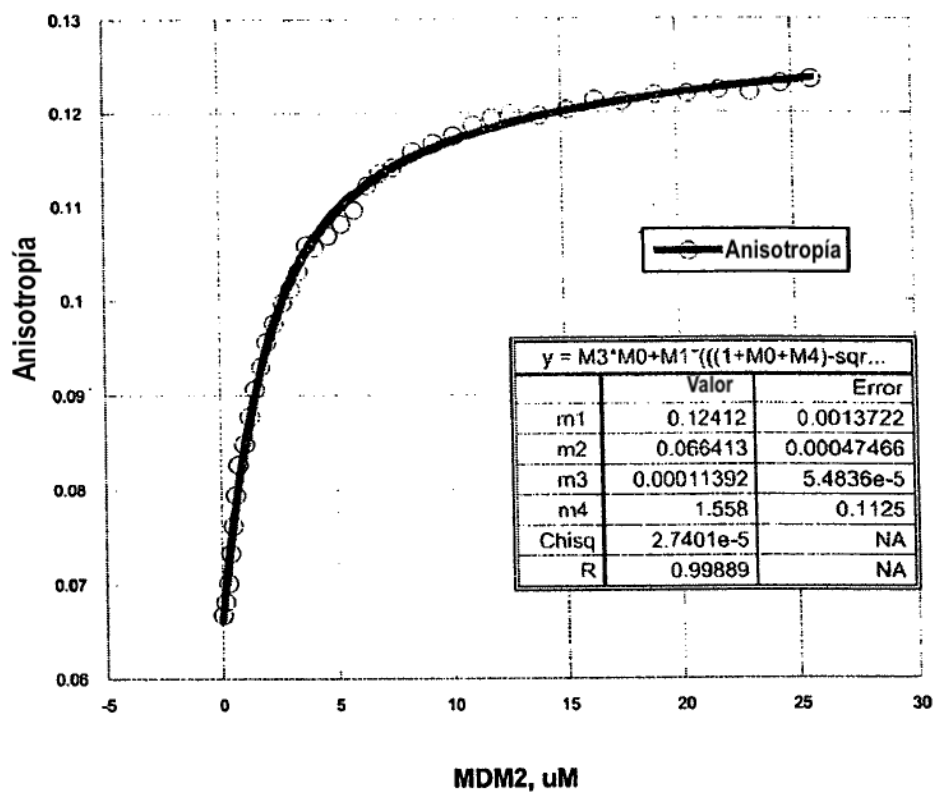


Figura 6