

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 867**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00	(2006.01) C40B 40/08	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01) C40B 40/10	(2006.01)
C07K 14/81	(2006.01)	
C12N 1/15	(2006.01)	
C12N 1/19	(2006.01)	
C12N 1/21	(2006.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	
C12N 15/09	(2006.01)	
C12P 21/02	(2006.01)	
C12Q 1/37	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2013 PCT/JP2013/071345**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14024914**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2013 E 13827389 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 2883954**

54 Título: **Biblioteca de péptidos y su uso**

30 Prioridad:

08.08.2012 JP 2012176208

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2021

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

NISHIMIYA, DAISUKE y
HASHIMOTO, RYUJI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 813 867 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

Biblioteca de péptidos y su uso

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un péptido, un derivado peptídico, un ácido nucleico correspondiente al péptido o al derivado peptídico, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula en la que se introduce el vector y/o el ácido nucleico, un procedimiento para producir el péptido y/o el derivado del mismo que comprende cultivar la célula, una biblioteca de péptidos que comprende el péptido y/o el derivado del mismo, un procedimiento para identificar un péptido y/o un derivado del mismo que se une a una molécula diana, un procedimiento para producir un péptido y/o un derivado del mismo que se une a una molécula diana, un procedimiento para determinar si un péptido de prueba
10 y/o un derivado del mismo se une a una molécula diana, una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende el ácido nucleico, una composición que comprende el péptido o el derivado del mismo, el ácido nucleico, el vector, o la célula, un reactivo que comprende el péptido o el derivado del mismo, el ácido nucleico, el vector, o la célula, etc.

Técnica antecedente

15 La SPINK2 (inhibidor de la serina proteasa Kazal-tipo 2) es una proteína de 7 kDa compuesta de dominios de tipo Kazal que tienen tres enlaces disulfuro. En el cuerpo humano, esta proteína se expresa en el testículo o la vesícula seminal y funciona como un inhibidor de la tripsina/acrosina (literatura no patente 1).

En 1991, Winter et al., informaron del cribado de anticuerpos usando la presentación en fagos, y esta presentación en fagos tuvo un gran impacto en el desarrollo de fármacos de anticuerpos al proporcionar un procedimiento para desarrollar anticuerpos completamente humanos (Literatura no patente 2). Con los recientes avances en la ingeniería
20 de proteínas, los andamios sin anticuerpos se han desarrollado cada vez más activamente utilizando técnicas de presentación como la presentación en fagos o la presentación en ribosomas. Estos andamios que no son anticuerpos, también llamados proteínas de unión de ingeniería (afinidad), etc., se refieren a proteínas artificiales provistas de regiones de unión similares a la región variable de anticuerpos (CDR). Los andamios que no son de anticuerpos tienen actividad de unión contra la proteína X a la que se va a direccionar y permiten la interacción proteína-proteína. Además,
25 los andamios sin anticuerpos tienen características beneficiosas desde el punto de vista de la productividad, la inmunogenicidad, la infiltración de tejidos, etc. Según lo tipificado por la biblioteca de dominio de Kunitz (Dyax Corp.) (literatura de patentes 1), anticalina (Pieris AG) o similares, solo se han desarrollado tipos limitados de andamios sin anticuerpos, aunque se ha deseado su crecimiento científico o industrial. Por lo tanto, se ha deseado el desarrollo de un nuevo andamio sin anticuerpos contra una molécula relacionada con enfermedad (literatura no patente 3). La
30 literatura de patentes 2 se refiere a la proteína SPINK2 humana. La literatura no patente 4 se refiere al mecanismo de inhibición de la proteína MRPINK, que inhibe específicamente la quimotripsina pero no la tripsina o la trombina.

Lista de citacionesLiteratura de Patentes

35 Literatura de Patentes 1: Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US2008/0020394 A1 (o Publicación Nacional Japonesa de Publicación de Solicitud Internacional de Patente No. 2007-524348)

Literatura sobre Patentes 2: Publicación de Solicitud de Patente PCT No. WO2006/125195 A2.

Literatura no patente

Literatura no patente 1: Chen T, Lee TR, Liang WG, Chang WS, Lyu PC. (2009) Identification of trypsin-inhibitory site and structure determination of human SPINK2 serine proteinase inhibitor. *Proteins* 77 (1): 209-19.

40 Literatura no patente 2: James D. Marks, Hennie R. Hoogenboom, Timothy P. Bonnert, John McCafferty, Andrew D. Griffiths, Greg Winter (1991) By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 222 (3): 581-97.

Bibliografía no patente 3: Skerra A. (2007) Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol.* 18: 295-304.

45 Literatura no patente 4: Ye Li et al. "Inhibition Mechanism and the Effects of Structure on Activity of Male Reproduction-Related Peptidase Inhibitor Kazal-Type (MRPINK) de *Macrobrachium rosenbergii*", *Marine Biotechnology*, Springer-Verlag, NE, vol. 11, no. 2, 16 de septiembre de 2008, páginas 252-259.

Sumario de la invenciónProblema técnico

50 Los presentes inventores han realizado estudios diligentes sobre SPINK2 y una variante de la misma, y en consecuencia completaron la presente invención, por ejemplo, preparando una biblioteca que comprende un péptido

que exhibe una alta actividad de unión contra una molécula distinta de una diana endógena de SPINK2 y aislar, de la biblioteca, un péptido que exhiba una alta actividad de unión contra una molécula diana distinta de la diana endógena.

Solución al problema

La presente invención se refiere a:

- 5 (1) una biblioteca de péptidos que comprende una pluralidad de péptidos diferentes en la que los péptidos comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias en la que la secuencia de nucleótidos ha sido modificada por reemplazo de una secuencia de nucleótidos que consiste en la 43ª base termina a la 93ª base termina con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por
- 10 SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias, en la que la biblioteca de péptidos tiene una diversidad de al menos 1×10^5 ;
- (2) la biblioteca de acuerdo con (1), en la que la biblioteca tiene una diversidad de al menos 1×10^8 , preferiblemente al menos 1×10^{10} ;
- 15 (3) la biblioteca de péptidos de acuerdo con (1) o (2), en la que cada uno del 1º Xaa al 5º Xaa, el 7º Xaa, el 9º Xaa y el 10º Xaa contando desde el extremo amino de la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias en cada péptido de dicha pluralidad de péptidos es independientemente cualquier aminoácido que no sea cisteína y prolina
- (4) la biblioteca de péptidos de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3), en la que cada uno del 6º Xaa y del 8º Xaa contando desde el extremo amino de SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias en cada péptido de dicha pluralidad de péptidos es independientemente cualquier aminoácido que no sea cisteína
- 20 (5) la biblioteca de acuerdo con una cualquiera de (1) a (4), en la que la biblioteca es una biblioteca de presentación de fagos, una biblioteca de presentación de ribosomas o una biblioteca de presentación de ácidos nucleicos;
- (6) un procedimiento para identificar un péptido que se une a una molécula diana, que comprende los siguientes pasos (i) y (ii):
- 25 (i) poner en contacto péptidos contenidos en la biblioteca de acuerdo con una cualquiera de (1) a (5) con la molécula diana; y
- (ii) recuperar un péptido que se une a la molécula diana;
- (7) el procedimiento de acuerdo con (6), en el que la molécula diana se deriva de un ser humano;
- (8) el procedimiento de acuerdo con (6) o (7), en el que la molécula diana no es un objetivo endógeno de SPINK2;
- 30 (9) el procedimiento de acuerdo con (8), en el que la diana endógena es la tripsina y/o la acrosina, en el que el péptido inhibe la actividad proteolítica de la serina proteasa y en el que el procedimiento comprende el paso adicional (iii): (iii) determinar que el péptido es positivo para la inhibición, cuando el péptido inhibe la actividad proteolítica de la serina proteasa;

Efectos ventajosos de la invención

- 35 La presente invención proporciona una biblioteca de péptidos útil en el cribado de un péptido que se une a una molécula diana deseada.

Breve descripción de los dibujos

- 40 [Figura 1] La Figura 1 es un diagrama que muestra que por ELISA se confirmó que los mutantes SPINK2 (policlonales) se unen a una molécula diana α -quimotripsina, en el que los mutantes SPINK2 obtenidos por barrido contra la molécula diana se exhibieron en un fago. Se usó BSA como una molécula de control negativo.
- [Figura 2] La Figura 2 es un diagrama que muestra que por ELISA se confirmó que los mutantes SPINK2 (policlonales) se unen a una calicreína plasmática de la molécula diana, en el que los mutantes SPINK2 obtenidos mediante el desplazamiento contra la molécula diana se exhibieron en un fago. Se usó BSA como una molécula de control negativo.
- 45 [Figura 3] La Figura 3 es un diagrama que muestra que por ELISA se confirmó que los mutantes SPINK2 (policlonales) se unen a una molécula diana hEGFR/Fc, en el que los mutantes SPINK2 obtenidos mediante el desplazamiento contra la molécula diana se exhibieron en un fago. Se usó BSA como una molécula de control negativo.

[Figura 4] La Figura 4 es un diagrama que muestra que por ELISA se confirmó que los mutantes SPINK2 (policlonales) se unen a una molécula diana hHER2/Fc, en el que los mutantes SPINK2 obtenidos mediante el desplazamiento contra la molécula diana se exhibieron en un fago. Se usó BSA como una molécula de control negativo.

5 [Figura 5] La Figura 5 es un diagrama que muestra el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras para analizar el estado molecular de un péptido de unión a α -quimotripsina (clon único) expresado en *Escherichia coli* y luego purificado.

10 [Figura 6] La Figura 6 es un diagrama que muestra el análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras para analizar el estado molecular de un péptido de unión a α -quimotripsina (clon único) expresado en *Escherichia coli* y luego purificado.

[Figura 7] La Figura 7 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo ELISA cuantitativo para las afinidades de unión de 8 tipos de péptidos de unión a α -quimotripsina expresados en *Escherichia coli* y luego purificados.

15 [Figura 8] La Figura 8 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo ELISA cuantitativo para las afinidades de unión de los péptidos de unión a α -quimotripsina Nos. 2 y 6 (clones 2 y 6) expresados en *Escherichia coli* y luego purificados.

[Figura 9] La Figura 9 es un diagrama que muestra los resultados de confirmar, mediante ELISA, la especificidad diana del péptido de unión a α -quimotripsina No 2 (clon 2) expresado en *Escherichia coli* y luego purificado.

20 [Figura 10] La Figura 10 es un diagrama que muestra los resultados de confirmar, mediante ELISA, la especificidad diana del péptido de unión a α -quimotripsina No. 6 (clon 6) expresado en *Escherichia coli* y luego purificado.

[Figura 11] La Figura 11 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo cuantitativo para la actividad inhibidora de quimotripsina de los péptidos de unión a α -quimotripsina Nos. 2 y 6 (clones 2 y 6) expresados en *Escherichia coli* y luego purificados.

25 [Figura 12] La Figura 12 muestra las secuencias de aminoácidos de regiones aleatorias en 8 tipos de mutantes SPINK2 (péptido de unión a α -quimotripsina Nos. 1, 2, 6, 7, 12 a 14 y 17) (SEQ ID NOs: 2 a 9).

[Figura 13] La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una región aleatoria en un péptido que tiene diversidad (SEQ ID NO: 1). Cada una de las posiciones de aminoácidos 2 a 8 y 10 a 14 representan cualquier aminoácido.

[Figura 14] La Figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento 1 (SEQ ID NO: 10).

30 [Figura 15-1] La Figura 15-1 muestra la secuencia de nucleótidos de pCANTAB 5E (la cual continuará en la Figura 15-2).

[Figura 15-2] La Figura 15-2 muestra la secuencia de nucleótidos de pCANTAB 5E (la cual continuará en la Figura 15-3; la secuencia de nucleótidos del "fragmento 2" está subrayada y es la SEQ ID NO: 11; la cual continuará en la Figura 15-3).

35 [Figura 15-3] La Figura 15-3 muestra la secuencia de nucleótidos de pCANTAB 5E (la cual continuará en la Figura 15-4).

[Figura 15-4] La Figura 15-4 muestra la secuencia de nucleótidos de pCANTAB 5E.

[Figura 16] La Figura 16 muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento 3 (SEQ ID NO: 12).

[Figura 17] La Figura 17 muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento 5 (SEQ ID NO: 13).

40 [Figura 18] La Figura 18 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SPINK2 (SEQ ID NO: 14).

[Figura 19] La Figura 19 muestra una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos descrita en la Figura 18 (SEQ ID NO: 15).

45 [Figura 20-1] La Figura 20-1 muestra la secuencia de nucleótidos de una plantilla de ADN para PCR que comprende los fragmentos 1 a 5 (SEQ ID NO: 16; la cual continuará con la Figura 20-2).

[Figura 20-2] La Figura 20-2 muestra la secuencia de nucleótidos de una plantilla de ADN para PCR que comprende los fragmentos 1 a 5 (SEQ ID NO: 16; una secuela de la Figura 20-1).

Descripción de las realizaciones

La presente divulgación proporciona un péptido, un derivado peptídico, una biblioteca de péptidos, un ácido nucleico, un vector, una célula, un procedimiento para producir el péptido y/o el derivado del mismo, un procedimiento para identificar un péptido y/o un derivado del mismo que tiene propiedades deseadas, un procedimiento para producir un péptido y/o un derivado del mismo que tiene propiedades deseadas, un procedimiento para determinar si un péptido de prueba o un derivado de prueba del mismo se une a una molécula diana, una biblioteca de ácidos nucleicos, una composición, un reactivo, etc. A continuación, se describirán diversos aspectos de la presente invención.

1. Péptido

La presente divulgación proporciona un péptido.

El "péptido" de la presente divulgación incluso incorpora un "polipéptido" y una "proteína" en su significado.

De acuerdo con una parte de la presente divulgación, el péptido incluye la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias. En la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 incluida en el péptido, cada uno de Xaa 1° a 12° Xaa contando desde el terminal amino es cualquier aminoácido, preferiblemente cualquier aminoácido que no sea cisteína.

De acuerdo con una parte de la presente divulgación, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias contenida en la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación, cada uno del 1° Xaa al 5° Xaa, el 7° Xaa, el 9° Xaa y el 10° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a los aminoácidos en las posiciones 2 a 6, 8, 11 y 12, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1) es cualquier aminoácido aparte de cisteína y prolina; cada uno del 6° Xaa y el 8° Xaa contando desde el extremo amino terminal (aminoácidos en las posiciones 7 y 10, respectivamente, en SEQ ID NO: 1) es cualquier aminoácido que no sea cisteína; el 11° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 13 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en tirosina, serina, fenilalanina, leucina y treonina; y el 12° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 14 en SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, ácido aspártico, leucina, lisina, glutamina, alanina y ácido glutámico. Alternativamente, cada uno de del 1° Xaa al 12° Xaa contados desde el extremo amino terminal puede ser un aminoácido variado por sustitución conservadora de aminoácidos (lo cual se describe en detalle en la otra parte de la presente divulgación) de un aminoácido seleccionado de cada grupo descrito en este párrafo.

De acuerdo con una parte de la presente divulgación, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias contenida en la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación, el 1° Xaa cuenta desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 2 en SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, metionina, leucina, triptófano y serina; el 2° Xaa que cuenta desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 3 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en treonina, arginina, triptófano y fenilalanina; el 3° Xaa que cuenta desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 4 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, histidina, triptófano, serina y fenilalanina; el 4° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 5 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano, arginina y leucina; el 5° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 6 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, arginina, leucina, histidina, triptófano, metionina y tirosina; el 6° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 7 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, histidina, prolina, lisina, triptófano, arginina y ácido aspártico; el 7° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 8 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, fenilalanina, triptófano, leucina, alanina y glicina; el 8° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 10 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en treonina, prolina, asparagina y serina; el 9° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 11 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano, metionina, tirosina y fenilalanina; el 10° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 12 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glutamina, valina, lisina, metionina, alanina, leucina y asparagina; el 11° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 13 en la SEQ ID NO: 1) es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina y leucina; y el 12° Xaa contando desde el extremo amino (correspondiente a un aminoácido en la posición 14 en la SEQ ID NO: 1) es lisina. Alternativamente, cada uno de del 1° Xaa al 12° Xaa contados desde el extremo amino terminal puede ser un aminoácido variado por sustitución conservadora de aminoácidos (lo cual se describe en detalle en la otra parte de la presente divulgación) de un aminoácido seleccionado de cada grupo descrito en este párrafo.

De acuerdo con una parte de la presente divulgación, el péptido de la presente divulgación puede comprender, además de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de la guanina de la primera base o la citosina de la 4ª base a la timina de la 42ª base en la SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias directamente o mediante 1 o 2 o más aminoácidos arbitrarios en el extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos, o un aminoácido secuencia codificada por una secuencia de nucleótidos desde la 94ª base de guanina hasta la 189ª base de citosina en la SEQ

ID NO: 14 en el Listado de Secuencias directamente o mediante 1 o 2 o más aminoácidos arbitrarios en el terminal carboxilo de la misma. La secuencia de aminoácidos de este péptido no tiene que comprender ácido aspártico codificado por la guanina de la 1ª base a la timina de la 3ª base en SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias, en su posición correspondiente. La secuencia de aminoácidos de este péptido puede comprender además cualquier secuencia de aminoácidos adicional. Ejemplos de dicho péptido pueden incluir, pero no se limitan a, un péptido contenido en una biblioteca SPINK2 mutada aleatoriamente preparada en el Ejemplo 1 descrita más adelante, y un péptido con una secuencia de aminoácidos determinada de una región aleatoria cribada de la biblioteca en el Ejemplo 3.

De acuerdo con una parte de la presente divulgación, los aminoácidos, excepto en el 1º Xaa al 12º Xaa, contando desde el extremo amino en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias contenido en la secuencia de aminoácidos del péptido puede variarse mediante sustitución, eliminación, adición y/o inserción. En esta secuencia de aminoácidos, el número de aminoácidos sustituidos, eliminados, añadidos o insertados, excepto en el 1º Xaa al 12º Xaa contando desde el extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias o la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia, puede ser de 1 a 10 (inclusive). El límite inferior del mismo es 1. El límite superior del mismo es 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2. 1 es el límite mínimo del mismo. La sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservadora.

En esta secuencia de aminoácidos, cada uno del 1º Xaa al 12º Xaa contando desde el extremo amino de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias o la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia es cualquier aminoácido, preferiblemente cualquier aminoácido que no sea cisteína, más preferiblemente un aminoácido seleccionado de cada grupo descrito anteriormente o un aminoácido variado del aminoácido por sustitución conservadora de aminoácidos.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" significa la sustitución de un cierto aminoácido por un aminoácido funcionalmente equivalente o similar al mismo. La sustitución conservadora de aminoácidos en el péptido provoca un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del péptido. Por ejemplo, uno o más aminoácidos similares en polaridad a los aminoácidos en el péptido actúan de manera funcionalmente equivalente al mismo y provocan un cambio estático en la secuencia de aminoácidos de este péptido. En general, la sustitución dentro de un determinado grupo puede considerarse conservadora en términos de estructura y función. Como es obvio para los expertos en la técnica, sin embargo, el papel de un residuo de aminoácido particular puede tener una implicación en la estructura tridimensional de una molécula que contiene el aminoácido. Por ejemplo, un residuo de cisteína puede tomar una forma oxidada (disulfuro) que tiene una polaridad menor que la de una forma reducida (tiol). Un resto alifático largo en una cadena lateral de arginina puede constituir características estructural y funcionalmente importantes. Además, una cadena lateral que contiene un anillo aromático (triptófano, tirosina y fenilalanina) puede contribuir a las interacciones ion-aromático o interacciones catión-pi. En este caso, la sustitución de un aminoácido que tiene dicha cadena lateral por un aminoácido que pertenece a un grupo ácido o no polar puede ser estructural y funcionalmente conservadora. Residuos como prolina, glicina y cisteína (forma disulfuro) pueden tener un impacto directo en la estructura tridimensional de la cadena principal y rara vez pueden sustituirse sin distorsión estructural.

Una sustitución conservadora de aminoácidos incluye, como se muestra a continuación, una sustitución específica basada en la similitud de la cadena lateral (L. Lehninger, Biochemistry, 2ª edición, pp 73-75, Worth Publisher, New York (1975)) y una sustitución típica.

(1) Grupo de aminoácidos no polares: alanina (en lo sucesivo, denominada "Ala" o simplemente como "A"), valina (en lo sucesivo, denominada "Val" o simplemente como "V"), leucina (en lo sucesivo, denominada "Leu" o simplemente como "L"), isoleucina (en lo sucesivo denominada "Ile" o simplemente como "I"), prolina (en lo sucesivo denominada "Pro" o simplemente como "P"), fenilalanina (en lo sucesivo, denominada "Phe" o simplemente como "F"), triptófano (en lo sucesivo denominado "Trp" o simplemente como "W") y metionina (en lo sucesivo denominada "Met" o simplemente como "M")

(2) Grupo de aminoácidos polares sin carga: glicina (en lo sucesivo denominada "Gly" o simplemente "G"), serina (en lo sucesivo denominada "Ser" o simplemente como "S"), treonina (en adelante referida como "Thr" o simplemente como "T"), cisteína (en lo sucesivo denominada "Cys" o simplemente como "C"), tirosina (en lo sucesivo denominada "Tyr" o simplemente como "Y"), asparagina (en adelante, denominado "Asn" o simplemente como "N") y glutamina (en adelante, denominado "Gln" o simplemente como "Q")

(3) Grupo de aminoácidos ácidos: ácido aspártico (en lo sucesivo, "Asp" o simplemente "D") y ácido glutámico (en lo sucesivo, "Glu" o simplemente "E")

(4) Grupo de aminoácidos básicos: lisina (en lo sucesivo denominada "Lys" o simplemente como "K"), arginina (en lo sucesivo denominada "Arg" o simplemente como "R") e histidina (en adelante referida como "His" o simplemente como "H")

Los aminoácidos de origen natural se pueden dividir en los siguientes grupos en función de las propiedades de sus cadenas laterales comunes:

(1) Grupo de aminoácidos hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu e Ile

(2) Grupo de aminoácidos hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn y Gln

(3) Grupo de aminoácidos ácidos: Asp y Glu

(4) Grupo de aminoácidos básicos: His, Lys y Arg.

5 (5) Grupo de aminoácidos que influyen en la dirección de la cadena principal: Gly y Pro

(6) Grupo de aminoácidos aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

En lo sucesivo, se mostrarán ejemplos de la sustitución conservadora. Sin embargo, la sustitución conservadora de aminoácidos de la presente divulgación no está limitada a los mismos.

Ala puede ser sustituido por, por ejemplo, Val, Leu, Ile, Met, norleucina, Pro, Phe o Trp.

10 Arg puede ser sustituido por, por ejemplo, Lys o His.

Asn puede ser sustituido por, por ejemplo, Cys, Ser, Thr, Gln, Tyr o Gly.

Asp puede ser sustituido por, por ejemplo, Glu.

Cys puede ser sustituido por, por ejemplo, Gly, Ser, Thr, Tyr, Asn o Gln.

Gln puede estar sustituir por, por ejemplo, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr o Asn.

15 Glu puede ser sustituido por, por ejemplo, Asp.

Gly puede ser sustituido por, por ejemplo, Ser, Cys, Thr, Tyr, Asn, Gln, Pro, Asp o Glu.

His puede ser sustituido por, por ejemplo, Lys o Arg.

Ile puede ser sustituido por, por ejemplo, Leu, Val, Met, Pro, Ala, Phe, Trp o norleucina.

Leu puede ser sustituido por, por ejemplo, norleucina, Ile, Val, Pro, Met, Ala, Phe, Trp o Met.

20 Lys puede ser sustituido por, por ejemplo, Arg o His.

Met puede ser sustituido por, por ejemplo, Ala, Val, Leu, Phe, Ile, Pro, Trp o norleucina.

Norleucina se puede sustituir por, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp.

Phe puede ser sustituido por, por ejemplo, Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr, Pro, o Met.

Pro puede ser sustituido por, por ejemplo, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Met, o Gly.

25 Ser puede ser sustituido por, por ejemplo, Thr, Cys, Asn, Gln, Gly, o Tyr.

Thr puede ser sustituido por, por ejemplo, Val, Ser, Gly, Cys, Tyr, Asn o Gln.

Trp puede ser sustituido por, por ejemplo, Tyr, Phe, Ala, Val, Leu, Ile, Pro o Met.

Tyr puede ser sustituido por, por ejemplo, Gly, Cys, Asn, Gln, Trp, Phe, Thr o Ser.

Val puede ser sustituido por, por ejemplo, Ile, Leu, Met, Trp, Phe, Ala, norleucina o Pro.

30 Ejemplos de la secuencia de aminoácidos (correspondiente a la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias: región aleatoria) contenida en la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación que tiene la secuencia de aminoácidos constituida de estos aminoácidos pueden incluir los siguientes, aunque la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación no está limitada a los mismos:

35 CRTRW GNRCT WQYKP VC (SEQ ID NO: 2 en el Listado de Secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 1 que se muestra en la Figura 12)

CMRHR RHFCT MVYKP VC (SEQ ID NO: 3 en el Listado de secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 2 que se muestra en la Figura 12)

40 CRRWL LPWCT YKYKP VC (SEQ ID NO: 4 en el Listado de Secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 6 que se muestra en la Figura 12)

CLWRR HKLCP FKFKP VC (SEQ ID NO: 5 en el Listado de Secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 7 que se muestra en la Figura 12)

CWRSW RWACP YMYKP VC (SEQ ID NO: 6 en el Listado de secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 12 que se muestra en la Figura 12)

5 CWFFR WRWCN WALKP VC (SEQ ID NO: 7 en el Listado de secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 13 que se muestra en la Figura 12)

CSTWR MWGCP WLYKP VC (SEQ ID NO: 8 en el Listado de secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 14 que se muestra en la Figura 12)

10 CWRRW YDRCS FNLKP VC (SEQ ID NO: 9 en el Listado de secuencias: péptido de unión a α -quimotripsina No. 17 que se muestra en la Figura 12)

En la presente divulgación, el aminoácido puede ser L-aminoácido, D-aminoácido o una mezcla de los mismos (DL-aminoácido) pero significa L-aminoácido a menos que se especifique lo contrario.

15 En la presente divulgación, un aminoácido puede ser cualquiera de los aminoácidos distintos de los descritos anteriormente (en adelante, estos aminoácidos se denominan colectivamente "aminoácidos anormales" por conveniencia). Ejemplos de aminoácidos anormales pueden incluir selenocisteína, N-formilmetionina, pirrolisina, ácido piroglutámico, cistina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tiroxina, O-fosfoserina, desmosina, β -alanina, sarcosina, ornitina, creatina, ácido γ -aminobutírico, opina, teanina, ácido tricolómico, ácido kaínico, ácido domoico y ácido acromélico, que se encuentran en péptidos o proteínas naturales. Ejemplos de aminoácidos no naturales pueden incluir, pero no se limitan a: aminoácidos protegidos en el terminal N tales como Ac-aminoácido, Boc-aminoácido, Fmoc-aminoácido, Trt-aminoácido y Z-aminoácido; aminoácidos protegidos en el terminal C tales como t-butil éster, bencil éster, ciclohexil éster y fluorenil éster de aminoácidos; y otros aminoácidos que incluyen diamina, ω aminoácido, β aminoácido, y aminoácido, derivados Tic de aminoácidos y ácido aminofosfónico.

20 El péptido de la presente divulgación puede prepararse mediante un procedimiento para producir péptidos o proteínas bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como síntesis química, recombinación génica o traducción *in vitro*. Además, el péptido identificado o cribado de la biblioteca de la presente invención o similar se puede preparar mediante dicho procedimiento.

25 Ejemplos del procedimiento de síntesis química pueden incluir, entre otros, un procedimiento con t-butoxicarbonilo (Boc) y un procedimiento con 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). El procedimiento Fmoc tiene ventajas tales como condiciones de desprotección leve y la conveniente escisión de péptidos a partir de resinas (Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach, ed. by W. C. Chan, P. D. White Eds., Oxford University Press, New York, 2000).

30 En la presente divulgación, el "derivado peptídico" y el "derivado peptídico" significan una forma químicamente modificada o biológicamente modificada del péptido de la presente divulgación. La modificación química significa la conversión del péptido original en una sustancia diferente a través de una reacción química, es decir, la formación o escisión de un enlace átomo-átomo, en o sobre el péptido de la presente divulgación. La modificación biológica significa la conversión del péptido original en una sustancia diferente a través de una reacción biológica, es decir, a través del uso de una proteína derivada del organismo (enzima, citoquina, etc.), ácido nucleico (ribosoma, etc.), célula, tejido u órgano, o un individuo no humano o por la acción directa o indirecta del mismo, en o sobre el péptido de la presente divulgación.

35 Este "derivado" no está particularmente limitado siempre que el derivado sea una sustancia diferente del péptido original. Ejemplos de los mismos pueden incluir una sustancia que contiene una cadena de azúcar natural o una cadena de azúcar desarrollada artificialmente, una sustancia que contiene un polímero como el polietilenglicol (PEG), una sustancia que contiene un compuesto sintético o un compuesto natural, una sustancia marcada, una sustancia que contiene un resto necesario para la inmovilización en fase sólida, una sustancia que contiene un péptido de señalización unido al extremo amino, una sustancia que contiene una etiqueta para su uso en purificación o aislamiento, una sustancia que contiene un aminoácido o una secuencia de aminoácidos derivada de un vector adecuado para despliegue, barrido, expresión, etc., una sustancia que contiene un aminoácido o una secuencia de aminoácidos producida por la variación de una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido para evitar el cambio de marco o para introducir sitios de enzimas de restricción, y una sustancia en la que un péptido como fenotipo está vinculado directa o indirectamente a un genotipo correspondiente al fenotipo, y combinaciones de dos o más e de los mismos.

40 El derivado peptídico de la presente divulgación se puede preparar sometiendo el péptido de la presente divulgación, como material de partida, a un procedimiento para modificar química o biológicamente péptidos o proteínas lo cual es bien conocido por los expertos en la técnica, como reacción química, reacción bioquímica o modificación postraduccion. El derivado peptídico identificado o cribado de la biblioteca de la presente invención o similar también se puede preparar mediante dicho procedimiento. Alternativamente, el derivado peptídico modificado postraduccion de la presente divulgación puede prepararse mediante recombinación génica usando una célula capaz de proporcionar

la modificación postraduccion deseada. Además, el derivado peptídico de la presente divulgación que contiene un aminoácido modificado se puede preparar añadiendo el aminoácido modificado a un sistema de traducción *in vitro*.

Ejemplos del procedimiento de PEGilación pueden incluir, entre otros, un procedimiento que implica la reacción de péptidos o proteínas con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS)-PEG.

- 5 De acuerdo con una parte de la divulgación, el péptido de la presente divulgación y el derivado del mismo se unen a una molécula diana (lo cual se describe en detalle en la otra parte de la presente divulgación). El péptido de la presente divulgación que se une a una molécula diana predeterminada es útil como, por ejemplo, un reactivo para probar diversas enfermedades para las cuales la molécula diana puede servir como marcador. Como se mencionó anteriormente, la presente divulgación abarca un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la
- 10 secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias contenida en la secuencia de aminoácidos del péptido por sustitución, eliminación, adición y/o inserción de 1 a varios (el término "varios" significa cualquier número entero de 1 a 10) aminoácidos excepto en el 1º Xaa al 12º Xaa contando desde el extremo amino. De acuerdo con una parte de la divulgación, este péptido se une a una molécula diana. Preferiblemente, la molécula diana es una predeterminada.
- 15 Ejemplos de la forma que puede tomar el péptido de la presente divulgación y el derivado del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, una forma aislada (preparación liofilizada, solución, etc.), una forma unida con una molécula adicional (forma inmovilizada en fase sólida, proteína de fusión, un ensamblaje con una molécula extraña, forma unida con una molécula diana, etc.), una colección física que contiene incluso otros péptidos, etc. (incluida la biblioteca de péptidos de la presente invención), una forma expresada o presentada en la superficie celular (en *Escherichia coli* o
- 20 superficie celular de levadura, etc.) (incluida la célula de la presente divulgación), y una forma expresada o presentada en una partícula viral. Una forma adecuada para un propósito como el uso o el almacenamiento se puede seleccionar libremente.

2. Ácido nucleico

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico.

- 25 En la presente divulgación, el "nucleótido" es un mononucleótido, un oligonucleótido o un polinucleótido y también se denomina "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico" o "gen". Ejemplos del ácido nucleico de la presente divulgación pueden incluir, pero sin limitación, ADN, ADNc, ARN, ARNm, ARNc, sondas, oligonucleótidos, polinucleótidos, cebadores y vectores. Además, el ácido nucleico de la presente divulgación puede ser cualquiera de los nucleótidos de cadena sencilla, los nucleótidos de doble cadena y un híbrido de 3 o más cadenas de nucleótidos
- 30 y abarca incluso un híbrido de nucleótidos de cadena sencilla que consiste en ADN y ARN, un grupo de nucleótidos de doble cadena que consisten en el nucleótido y su cadena complementaria, un híbrido de doble cadena que consiste en ADN de cadena sencilla y ARN de cadena sencilla, ARN de doble cadena, nucleótidos de cadena sencilla que pueden tener un resto estructural de doble cadena en su molécula, etc. El ácido nucleico de la presente divulgación puede contener además una o más bases (desarrolladas artificialmente) o uno o más mononucleótidos, que no sean
- 35 bases o mononucleótidos naturales.

- Ejemplos del ácido nucleico de la presente divulgación pueden incluir un ácido nucleico que comprende nucleótidos que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación, y un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación. Este ácido nucleico puede contener una secuencia de nucleótidos
- 40 distinta de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación, y/o un resto no nucleótido y puede modificarse química o biológicamente (lo cual se describe en la otra parte de la presente divulgación). Estas formas están todas abarcadas por el "ácido nucleico".

El ácido nucleico de la presente divulgación también abarca un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación.

- 45 En la presente divulgación, en el caso en que la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación está codificada por una parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos de ciertos nucleótidos, este ácido nucleico se denomina "ácido nucleico", correspondiente al péptido "y este péptido se denomina" péptido correspondiente al ácido nucleico".

- Ejemplos del ácido nucleico correspondiente al péptido de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación, y un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación.

- 55 Los ejemplos del péptido correspondiente al ácido nucleico de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, un péptido que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por una porción o la totalidad de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la presente divulgación, un péptido que comprende

una secuencia de aminoácidos codificada por una porción o la totalidad de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la presente divulgación, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por una porción o la totalidad de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la presente divulgación, y un derivado de cualquiera de estos péptidos.

- 5 En la presente divulgación, la expresión "genotipo correspondiente a (el) fenotipo" también se usa indistintamente con el "ácido nucleico correspondiente al péptido". Asimismo, la expresión "fenotipo correspondiente al (el) genotipo" también se usa indistintamente con el "péptido correspondiente al ácido nucleico".

10 Cuando la forma modificada química o biológicamente del ácido nucleico de la presente divulgación contiene el péptido de la presente divulgación, esta forma modificada está comprendida en el alcance del "derivado peptídico" de la presente divulgación.

15 Otros ejemplos del ácido nucleico de la presente divulgación pueden incluir, del ácido nucleico descrito anteriormente, un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación que se une a una molécula diana, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación que se une a una molécula diana, y un ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido del presente divulgación que se une a una molécula diana.

20 En la presente divulgación, uno o más codones correspondientes a cada aminoácido pueden usarse para diseñar la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos única de un determinado péptido o proteína puede tener una pluralidad de variaciones. Para la selección de tales codones, los codones pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el uso de codones de las células (células huésped) para albergar un genotipo correspondiente al péptido, es decir, un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, o la frecuencia o velocidad de una pluralidad de codones utilizados puede ajustarse adecuadamente. Por ejemplo, en el caso de usar células de *Escherichia coli* como células huésped, la secuencia de nucleótidos puede diseñarse usando codones con alta frecuencia de uso en *Escherichia coli*.

25 El ácido nucleico de la presente divulgación puede prepararse mediante un procedimiento para producir un ácido nucleico bien conocido por los expertos en la técnica, tal como síntesis química o recombinación génica. Un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido recuperado de la biblioteca de la presente invención o similar (incluido el cribado, enriquecido y aislado) mediante el procedimiento de identificación de la presente invención también puede prepararse mediante dicho procedimiento.

30 Ejemplos de la forma que puede tomar el ácido nucleico de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, una forma aislada (preparación liofilizada, solución, etc.), una forma unida con una molécula adicional (forma inmovilizada en fase sólida, etc.), un vector recombinante que comprende el ácido nucleico (el vector de la presente divulgación), una célula en la que se introduce el ácido nucleico o el vector (la célula de la presente divulgación), una forma contenida en un virus o una partícula viral (que incluye una forma contenida como el vector de la presente divulgación), y una colección física que contiene incluso otros ácidos nucleicos, etc. (incluida la biblioteca de ácidos nucleicos de la presente divulgación). Una forma adecuada para un propósito como el uso o el almacenamiento se puede seleccionar libremente.

3. Vector

40 La presente divulgación proporciona un vector recombinante (en adelante, también denominado simplemente "vector").

45 El vector de la presente divulgación no está particularmente limitado siempre que el vector comprenda el ácido nucleico de la presente divulgación y sirva como medio para transferir el ácido nucleico de la presente divulgación a células, microorganismos o individuos. Ejemplos de los mismos pueden incluir vectores de ácido nucleico tales como fagémidos, cósmidos y plásmidos.

El vector de la presente divulgación puede ser un virus que infecta células procariotas o células eucariotas, o un vector viral.

50 En la presente divulgación, el "fagémido" significa un plásmido bacteriano que contiene un origen de replicación de plásmido, así como el segundo origen de replicación derivado de un bacteriófago de cadena sencilla. Una célula que tiene este fagémido puede replicar el fagémido a través de un modo de replicación de cadena sencilla en coinfección con M13 o su bacteriófago auxiliar análogo. Específicamente, el ADN de fagémido de cadena sencilla se empaqueta en una partícula infecciosa recubierta con una proteína de recubrimiento bacteriófago. De esta manera, el ADN del fagémido se puede formar como un plásmido de ADN de doble cadena clonado en la bacteria infectada, mientras que el fagémido se puede formar como una partícula similar al bacteriófago del sobrenadante de cultivo de la célula coinfectada. Para infectar una bacteria que tiene pilus F con el ADN, la partícula similar a un bacteriófago puede inyectarse en la bacteria para reformar la partícula misma como un plásmido.

Un gen de fusión que comprende el ácido nucleico correspondiente al péptido de la presente divulgación y un gen de proteína de recubrimiento bacteriófago puede insertarse en el fagémido. Las células bacterianas pueden infectarse con el fagémido resultante y cultivarse para expresar o presentar (un sinónimo de presentación) el péptido en la bacteria o una partícula similar a un fago o para producir una proteína de fusión del péptido y la proteína de recubrimiento en una partícula de fago o el sobrenadante de cultivo de la bacteria.

Por ejemplo, un gen de fusión que comprende el ácido nucleico correspondiente al péptido de la presente divulgación y un gen de proteína de recubrimiento bacteriófago gpIII puede insertarse en el fagémido. Puede coinfectarse *Escherichia coli* con el fagémido resultante y M13 o su fago auxiliar análogo para producir una proteína de fusión que comprende el péptido y la proteína de la cubierta en el sobrenadante de cultivo de *Escherichia coli*. Esta proteína de fusión está incluida en el alcance del derivado peptídico de la presente divulgación.

En lugar del fagémido, se pueden usar diversos vectores circulares o no circulares, preferiblemente vectores virales, para expresar o presentar (un sinónimo de presentación) el péptido codificado por la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la presente divulgación contenida en el vector, en una célula o una partícula similar a un virus en la que se introduce el vector, o para producir el péptido en el sobrenadante de cultivo de la célula de acuerdo con un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica.

El vector (vector recombinante) de la presente divulgación puede prepararse mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, tal como la recombinación génica.

Los ejemplos de la forma que puede tomar el vector de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, una forma aislada (preparación liofilizada, solución, etc.), una forma unida con una molécula adicional (forma inmovilizada en fase sólida, etc.), una forma transferida a una célula (que incluye la célula recombinante de la presente divulgación), y una colección física que contiene incluso otros vectores, etc. (que incluye una parte particular de la biblioteca de ácidos nucleicos de la presente divulgación). Una forma adecuada para un propósito como el uso o el almacenamiento se puede seleccionar libremente.

4. Célula

De acuerdo con una parte, la presente divulgación proporciona una célula recombinante (en adelante, también denominada simplemente "célula").

La célula de la presente divulgación es una célula que contiene un ácido nucleico correspondiente al péptido de la presente divulgación y que expresa el péptido. Cualquiera de las células eucariotas (incluidas las líneas celulares establecidas, las células cultivadas primarias y las células subcultivadas) y las células procariotas pueden usarse como una célula huésped o célula de la presente divulgación sin limitaciones particulares.

Ejemplos de las células procariotas pueden incluir, pero no se limitan a, células bacterianas tales como células de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Ejemplos de las células eucariotas pueden incluir células animales, células de insectos, células de levadura y células fúngicas. Ejemplos de las células animales pueden incluir, entre otras, células COS de mono (Gluzman, Y., Cell (1981), vol. 23, págs. 175-182; American Type Culture Collection No. ATCC CRL-1650), fibroblastos de ratón NIH3T3 (American Type Culture Collection No. ATCC CRL-1658), células de ovario de hámster chino (células CHO; American Type Culture Collection No. ATCC CCL-61), y líneas de células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. and Chasin, LA, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos (1980), vol. 77, págs. 4126-4220).

La célula de la presente divulgación puede prepararse transfiriendo el ácido nucleico de la presente divulgación o el vector de la presente divulgación a una célula huésped y puede prepararse preferiblemente transfiriendo el vector de la presente divulgación a una célula huésped por transfección, transformación, transducción o similares.

Ejemplos del vector adecuado para la preparación de la célula de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, replicones derivados de una especie compatible con la célula procariota, es decir, plásmidos, cósmidos y fagémidos que contienen un origen de replicación y una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de una secuencia reguladora, sitio de inicio de la transcripción, codón de inicio y codón de detención (de traducción), etc. El ácido nucleico o el vector pueden contener además una secuencia de nucleótidos que puede conferir selectividad de carácter fenotípico (fenotipo) a la célula en la que se introduce el vector o el ácido nucleico. Tal vector o ácido nucleico se puede transferir a una célula huésped, y la célula obtenida se puede cultivar para expresar el péptido de la presente divulgación.

Una célula huésped adecuada para la modificación postraducción del péptido de la presente divulgación puede usarse como la célula de la presente divulgación. La célula de la presente divulgación puede usarse en (una parte de) el procedimiento para preparar el derivado peptídico de la presente divulgación, por ejemplo.

Ejemplos de la forma que puede tomar la célula de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, una forma aislada (preparación congelada, preparación liofilizada, solución, etc.), una forma unida con una molécula adicional (forma inmovilizada en fase sólida, etc.), una célula en la que se introduce el ácido nucleico o el vector de la

presente divulgación (que se incluye en la célula de la presente divulgación), una célula que se expresa o presenta (un sinónimo con enseñar) el péptido de la presente divulgación en su superficie (que está incluida en la célula de la presente divulgación), y una colección física que contiene incluso otras células, etc. (incluyendo una parte particular de la biblioteca de ácidos nucleicos de la presente divulgación) y la biblioteca de péptidos de la presente invención). Una forma adecuada para un propósito como el uso o el almacenamiento se puede seleccionar libremente.

5. Procedimiento para producir el péptido

De acuerdo con una parte alternativa, la presente divulgación también proporciona un procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación.

El péptido de la presente divulgación puede prepararse, como se mencionó anteriormente, mediante un procedimiento para producir péptidos o proteínas bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como síntesis química, recombinación génica o traducción *in vitro*. Un péptido recuperado de la biblioteca de la presente invención o similar (incluido el cribado, enriquecido y aislado) mediante el procedimiento de identificación de la presente invención también puede prepararse mediante dicho procedimiento.

En el presente documento, el procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación comprende los siguientes pasos (1-1) y (1-2):

(1-1) cultivar una célula (la célula de la presente divulgación) que contiene el ácido nucleico correspondiente al péptido de la presente divulgación y que expresa el péptido o similar; y

(1-2) recuperar el péptido del cultivo.

De acuerdo con una parte alternativa, el procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación comprende los siguientes pasos (2-1) y (2-2):

(2-1) determinar la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente divulgación que se une a una molécula diana; y

(2-2) preparar un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mediante síntesis química o recombinación genética.

De acuerdo con una parte alternativa adicional, el procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación comprende los siguientes pasos (3-1) y (3-2):

(3-1) preparar ARNm correspondiente al péptido de la presente divulgación; y

(3-2) preparar el péptido mediante traducción *in vitro* con el ARNm obtenido en el paso (3-1) como plantilla.

Además, cada uno de estos procedimientos de producción se puede combinar apropiadamente con el procedimiento de identificación de la presente invención como un paso previo. Específicamente, primero, se llevan a cabo los pasos incluidos en el procedimiento de identificación de la presente invención, y posteriormente, se pueden llevar a cabo los pasos incluidos en el procedimiento de producción de la presente divulgación. El procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación puede abarcar dicho procedimiento que comprende adicionalmente (cada paso de) el procedimiento de identificación de la presente invención.

Un procedimiento de este tipo para producir el péptido de la presente divulgación comprende, por ejemplo, los siguientes pasos (4-1) a (4-3):

(4-1) poner en contacto los péptidos contenidos en la biblioteca de péptidos de la presente invención con una molécula diana;

(4-2) recuperar un péptido que se une a la molécula diana; y

(4-3) preparar el péptido recuperado mediante síntesis química, recombinación génica o traducción *in vitro*.

Del mismo modo, cada uno de estos procedimientos de producción se puede combinar apropiadamente con el procedimiento de determinación de la presente divulgación como un paso anterior. Específicamente, primero, se llevan a cabo los pasos incluidos en el procedimiento de determinación de la presente divulgación, y posteriormente, se pueden llevar a cabo los pasos incluidos en el procedimiento de producción de la presente divulgación. El procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación o similar puede abarcar dicho procedimiento que comprende adicionalmente (cada paso de) el procedimiento de determinación de la presente divulgación.

Un procedimiento de este tipo para producir el péptido de la presente divulgación o similar comprende, por ejemplo, los siguientes pasos (5-1) a (5-3):

(5-1) poner en contacto los péptidos de prueba de la presente divulgación con una molécula diana;

(5-2) determinar que el péptido de prueba es positivo para la unión cuando el péptido de prueba se une a la molécula diana, y

(5-3) cuando se ha determinado que el péptido de prueba es positivo en el paso (5-2), preparar el péptido mediante síntesis química, recombinación génica o traducción *in vitro*.

5 De acuerdo con una parte alternativa, el procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación comprende adicionalmente el paso de identificar un péptido que se une a una molécula diana distinta de la tripsina y/o la acrosina que son moléculas diana endógenas de SPINK2, preferiblemente otras diferentes de la tripsina y, parcial o completamente, activa o promueve, o inhibe, inactiva o suprime, la actividad biológica de la molécula diana. Este procedimiento de producción comprende, por ejemplo, los siguientes pasos (6-1) a (6-3) o (7-1) a (7-3):

10 (6-1) contactar péptidos contenidos en la biblioteca de péptidos de la presente invención con la molécula diana;

(6-2) recuperar un péptido que se une a la molécula diana; y

(6-3) determinar que el péptido es positivo, cuando el péptido activa o promueve la actividad biológica de la molécula diana o agoniza la molécula diana, o (7-1) pone en contacto los péptidos contenidos en la biblioteca de péptidos de la presente invención con la molécula diana;

15 (7-2) recuperar un péptido que se une a la molécula diana; y

(7-3) determinar que el péptido es positivo, cuando el péptido inhibe, inactiva o suprime la actividad biológica de la molécula diana o antagoniza la molécula diana.

De acuerdo con una parte alternativa adicional, el procedimiento de producción de la presente divulgación comprende, por ejemplo, los siguientes pasos (8-1) y (8-2) o (9-1) y (9-2) en lugar de los pasos (6-1) a (6-3) o (7-1) a (7-3):

20 (8-1) poner en contacto péptidos de prueba con una molécula diana distinta de la tripsina y/o la acrosina, preferiblemente distinta de la tripsina; y

(8-2) determinar que el péptido es positivo, cuando el péptido activa o promueve la actividad biológica de la molécula diana, o agoniza la molécula diana, o (9-1) pone en contacto péptidos de prueba con una molécula diana distinta de la tripsina y/o acrosina, preferiblemente que no sea tripsina; y

25 (9-2) determinar que el péptido es positivo, cuando el péptido inhibe, inactiva o suprime la actividad biológica de la molécula diana, o antagoniza la molécula diana.

El péptido que activa o promueve la actividad biológica de la molécula diana o el péptido que agoniza la molécula diana (péptido agonista) puede producirse mediante los pasos (6-1) a (6-3) o (8-1) y (8-2), o similar combinado con un paso equivalente al paso (4-3) o (5-3), o similar. Del mismo modo, el péptido que inhibe, inactiva o suprime la actividad biológica de la molécula diana o el péptido que antagoniza la molécula diana (péptido antagonista) puede producirse mediante los pasos (7-1) a (7-3) o (9-1) y (9-2), o similar combinado con un paso equivalente al paso (4-3) o (5-3), o similar.

35 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para producir el derivado peptídico (derivado peptídico) de la presente divulgación. El derivado peptídico de la presente divulgación puede prepararse, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito anteriormente (procedimiento para producir el péptido) y luego someter el péptido preparado a reacción química, reacción bioquímica, modificación postraducción o similar, pero no limitado a los mismos.

40 En lugar del péptido preparado en la etapa (2-2), (3-2), (4-3) o (5-3), un péptido (X') que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del péptido (X) mediante la eliminación de 1 o 2 o más aminoácidos o secuencias de aminoácidos parciales. La presente divulgación también abarca un procedimiento para producir el péptido (X'). El péptido (X') preparado por este procedimiento se une preferiblemente a una molécula diana. En la secuencia de aminoácidos de dicho péptido (X'), 1 o 2 o más aminoácidos o secuencias de aminoácidos parciales que están contenidas en la secuencia de aminoácidos del péptido original, pero que no son esenciales para la unión a la molécula diana, pueden ser eliminados.

45 Los ejemplos del procedimiento para producir el derivado peptídico de la presente divulgación pueden incluir, pero no se limitan a, un procedimiento que comprende cada uno de los pasos (1-1) y (1-2), (2-1) y (2-2), (3-1) y (3-2), (4-1) a (4-3), (5-1) a (5-3), (6-1) a (6-3), (7-1) a (7-3), (8-1) y (8-2), o (9-1) y (9-2), o similares y que además comprende el paso de preparar el derivado peptídico de la presente divulgación usando el péptido de la presente divulgación como material de partida (en lo sucesivo, denominado "paso de preparación del derivado"), un procedimiento que comprende el paso de preparar el derivado peptídico en lugar del péptido en cada uno de los pasos (2-2), (3-2), (4-3) y (5-3), un procedimiento que usa una biblioteca de péptidos que originalmente contiene el derivado peptídico, y un procedimiento que usa derivados peptídicos de prueba en lugar de los péptidos de prueba.

En lugar del derivado peptídico preparado en la etapa (2-2), (3-2), (4-3) o (5-3) que puede estar comprendido en el procedimiento para producir el derivado peptídico de la presente divulgación, se puede preparar un derivado peptídico

(Y') que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos del derivado peptídico (Y) mediante la eliminación de 1 o 2 o más aminoácidos o secuencias de aminoácidos parciales. La presente divulgación también abarca un procedimiento para producir el derivado peptídico (Y'). El derivado peptídico (Y') preparado por este procedimiento se une preferiblemente a una molécula diana. En la secuencia de aminoácidos de dicho derivado peptídico (Y'), 1 o 2 o más aminoácidos o secuencias de aminoácidos parciales que están contenidas en la secuencia de aminoácidos del derivado peptídico original, pero que no son esenciales para unirse a la molécula diana puede ser eliminada. Alternativamente, una célula capaz de proporcionar la modificación postraduccion deseada puede usarse en el procedimiento para producir el péptido de la presente divulgación para preparar el derivado peptídico de la presente divulgación como un péptido provisto de la modificación postraduccion deseada. En este caso, por ejemplo, la célula capaz de proporcionar la modificación postraduccion deseada puede usarse como la célula en los pasos (1-1) y (1-2) o como una célula (o célula huésped) aplicada al gen recombinación en los pasos (2-2), (4-3) y (5-3) para preparar el derivado peptídico provisto de la modificación postraduccion deseada, aunque el procedimiento para preparar la forma modificada postraduccion del péptido (como parte del procedimiento para producir el derivado peptídico) de la presente divulgación no se limita al mismo.

6. Biblioteca

La presente invención proporciona una biblioteca.

En la presente invención, la "biblioteca" significa una colección física de moléculas que son análogas, pero no idénticas, entre sí. Las moléculas contenidas en esta colección pueden coexistir, por ejemplo, en un contenedor o pueden estar presentes de forma físicamente aislada como grupos o moléculas individuales en diferentes contenedores o en diferentes sitios en un soporte de fase sólida. Se puede contener una pluralidad de bibliotecas en una colección.

La biblioteca de la presente invención no está limitada por ningún medio siempre que la biblioteca sea una colección física que contenga péptidos y/o ácidos nucleicos no idénticos de la presente divulgación. Ejemplos de los mismos pueden incluir una biblioteca de presentación de fagos, una biblioteca de presentación de ribosomas y una biblioteca de presentación de ácido nucleico.

La "presentación en fagos" significa una técnica (procedimiento y medios para ello) de unir péptidos o proteínas extrañas a las proteínas de recubrimiento de fagos filamentosos o similares y expresar o presentar las proteínas de fusión resultantes en partículas similares a fagos. Además, la recuperación (incluido el cribado, el enriquecimiento y el aislamiento) de los ácidos nucleicos correspondientes a los péptidos o proteínas que utilizan esta técnica está incluida en el alcance de la "presentación de fagos". La biblioteca de presentación de fagos es un aspecto de la biblioteca de la presente invención utilizada en esta técnica.

La "presentación de ribosomas" significa una técnica (procedimiento y medios para ello) de expresar o presentar péptidos o proteínas en forma de complejos que comprenden tres moléculas (ARNm-ribosoma-péptido o proteína), que se forman durante la reacción de traducción, de la traducción *in vitro*. En este contexto, los péptidos o proteínas son productos de traducción de los ARNm. Además, la recuperación (que incluye el cribado, el enriquecimiento y el aislamiento) de los ácidos nucleicos correspondientes a los péptidos o proteínas que utilizan esta técnica está incluida en el alcance de la "presentación de ribosomas". La biblioteca de presentación de ribosomas es un aspecto alternativo de la biblioteca de la presente invención utilizada en esta técnica.

La "presentación de ácido nucleico" significa una técnica (procedimiento y medios para ello) de expresar o presentar péptidos o proteínas en forma de complejos que comprenden un ácido nucleico (sinónimo de ácidos nucleicos) y péptidos o proteínas correspondientes al ácido nucleico (Keefe, A.D. and Szostak, J.W., Nature, vol. 410 (2001), págs. 715-718). Además, la recuperación (que incluye el cribado, el enriquecimiento y el aislamiento) de un ácido nucleico correspondiente a los péptidos o proteínas usando esta técnica está incluida en el alcance de la "presentación de ácido nucleico". La biblioteca de presentación de ácido nucleico es un aspecto alternativo adicional de la biblioteca de la presente invención utilizada en esta técnica.

Ejemplos de la presentación de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, presentación de ARNm (Yamaguchi, J. et al., Nucleic Acids Research, vol. 37, No. 16 e108, pp 1-13 (2009)).

La presentación de ARNm es una técnica de presentación de péptidos o proteínas en forma de complejos que comprenden ARNm y sus productos de traducción, péptidos o proteínas asociados mediante restos intermedios (Keefe, A.D. and Szostak, J.W., Nature, vol. 410 (2001), pp 715-718).

En la presente invención, una colección física de células, una colección física de microorganismos (incluidos virus, fagos, moléculas similares a fagos, partículas de los mismos, etc.) y una colección física de vectores naturales o desarrollados artificialmente (incluyendo fagémidos, cósmidos, plásmidos, etc.), que comprenden una colección física que contiene péptidos y/o ácidos nucleicos no idénticos de la presente invención, así como una colección física de sus fragmentos y una colección física de formas química y/o biológicamente modificadas de los mismos también están incluidas en el alcance de la "biblioteca".

En la presente divulgación, como se mencionó anteriormente, uno o más codones correspondientes a cada aminoácido pueden usarse para diseñar la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos única de un determinado péptido o proteína puede tener una pluralidad de variaciones. Para la selección de tales codones, se pueden seleccionar los codones apropiados de acuerdo con el uso de codones de las células (células huésped) en las que se introduce un genotipo correspondiente al péptido, es decir, un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, o la frecuencia o tasa de una pluralidad de codones utilizados puede ajustarse adecuadamente. Por consiguiente, en la biblioteca de ácidos nucleicos de la presente divulgación, cada ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos única puede tener una pluralidad de variaciones. Específicamente, la biblioteca de ácidos nucleicos de la presente divulgación puede comprender una colección física que contiene ácidos nucleicos, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un determinado péptido. Esta colección física de los ácidos nucleicos correspondientes al péptido particular puede formar en sí misma una biblioteca de nucleótidos.

La biblioteca de la presente invención contiene una pluralidad de moléculas que son análogas, pero no idénticas, entre sí. Los (número de) tipos de moléculas análogas contenidas en la biblioteca se denominan "diversidad de (la) biblioteca". Por ejemplo, la diversidad de una biblioteca que consta de 100 tipos de moléculas análogas es 10^2 . En la presente invención, la diversidad de la biblioteca no está particularmente limitada y preferiblemente tiene un valor más alto.

La diversidad de la biblioteca de péptidos para uso en el procedimiento de identificación de la presente invención y el procedimiento para producir el péptido, que comprende los pasos del procedimiento de identificación es 1×10^5 o superior, 2×10^5 o superior, 5×10^5 o superior, 1×10^6 o superior, 2×10^6 o superior, 5×10^6 o superior, 1×10^7 o superior, 2×10^7 o superior, 5×10^7 o superior, 1×10^8 o superior, 2×10^8 o superior, 5×10^8 o superior, 1×10^9 o superior, 2×10^9 o superior, 5×10^9 o superior, 1×10^{10} o superior, 2×10^{10} o superior, 5×10^{10} o superior, 1×10^{11} o superior, 2×10^{11} o superior, 5×10^{11} o superior, 1×10^{12} o superior, 2×10^{12} o superior, 5×10^{12} o superior, 1×10^{13} o superior, 2×10^{13} o superior, 5×10^{13} o superior, 1×10^{14} o superior, 2×10^{14} o superior, 5×10^{14} o superior, 1×10^{15} o superior, 2×10^{15} o superior, 5×10^{15} o superior, 1×10^{16} o superior, 2×10^{16} o superior, 5×10^{16} o superior, o 1×10^{17} o superior. Tal diversidad de la biblioteca no se limita a un valor medido real y puede ser un valor teórico.

7. Procedimiento de identificación.

La presente invención proporciona un procedimiento para identificar un péptido que se une a una molécula diana. El procedimiento de identificación de la presente invención puede comprender, por ejemplo, los pasos (4-1) y (4-2), (6-1) y (6-2), (7-1) y (7-2), o similares, aunque el procedimiento de identificación de la presente invención no se limita a los mismos.

(1) Molécula diana

En la presente invención, la "molécula diana" significa una sustancia a la que se une el péptido de la presente divulgación y también significa una sustancia endógena presente en un individuo animal humano o no humano o una sustancia exógena incorporada *in vivo* en el individuo. La molécula diana de la presente divulgación es preferiblemente una molécula distinta de la tripsina y/o la acrosina que son objetivos endógenos de SPINK2, más preferiblemente distinta de la tripsina. La molécula diana de la presente divulgación es incluso más preferiblemente una molécula derivada del ser humano distinta de la tripsina derivada del ser humano. La molécula diana de la presente divulgación es aún más preferiblemente cualquiera de las enzimas endógenas o exógenas, receptores, ligandos de los receptores, factores humorales (por ejemplo, citoquinas), otros biopolímeros, transductores de señal, células, patógenos, toxinas y sustancias derivadas de uno o más de los mismos, por ejemplo, fragmentos, productos de descomposición, metabolitos o productos procesados de los mismos, que pueden estar involucrados directa o indirectamente en el inicio o exacerbación de una enfermedad que puede afectar al individuo humano, o exhibe correlación o correlación inversa con la enfermedad (en lo sucesivo denominada "molécula diana relacionada con la enfermedad"). Alternativamente, la molécula diana de la presente divulgación puede ser cualquiera de sustancias no naturales tales como minerales, polímeros, plásticos y compuestos sintéticos de bajo peso molecular.

De acuerdo con una parte de la presente divulgación, la molécula diana es preferiblemente una proteasa distinta de la tripsina y/o la acrosina, más preferiblemente distinta de la tripsina. La molécula diana es incluso más preferiblemente una serina proteasa, más preferiblemente una serina proteasa de tipo endo. Ejemplos de la serina proteasa de tipo endo pueden incluir quimotripsina. Para la purificación y/o aislamiento de un componente proteico particular de un tejido, un fluido corporal, una célula, etc., se puede agregar un inhibidor de proteasa adecuado a una fracción que contiene este componente para reducir así la lisis del componente. Tal inhibidor de proteasa es útil en la producción de diversas proteínas recombinantes y no recombinantes.

Además, la proteasa es preferiblemente una molécula diana relacionada con la enfermedad.

La molécula diana de la presente divulgación se usa, por ejemplo, para cribar la biblioteca de péptidos de la presente invención para un péptido que se une a la molécula diana, un péptido que agoniza la molécula diana o un péptido que antagoniza la molécula diana, o para determinar la actividad de unión, actividad agonista o actividad antagonista de

un péptido de prueba contra la molécula diana. La molécula diana puede ser una molécula de longitud completa o un fragmento de la misma, o un derivado de la misma, con cualquier aminoácido, péptido, proteína, cadena de azúcar, polímero, vehículo o similar añadido a la misma. Alternativamente, la molécula diana puede estar inmovilizada en fase sólida.

5 (2) Preparación de la molécula diana

La molécula diana de la presente divulgación puede aislarse y/o purificarse, para su uso, de un tejido o una célula afectada con una enfermedad o puede usarse en la forma en que toda o una parte de la misma está unida a o contenida en el tejido, la célula o similares. Además, la molécula diana de la presente divulgación puede prepararse mediante un procedimiento para producir péptidos o proteínas que es bien conocido por los expertos en la técnica, tal como síntesis química, recombinación génica o traducción *in vitro*. A partir de la molécula diana así obtenida, el derivado como se mencionó anteriormente puede prepararse, si es necesario.

En la presente divulgación, el péptido o proteína diana puede prepararse mediante, por ejemplo: traducción *in vitro*, es decir, un procedimiento que implica incubar un ácido nucleico (tal como ADN o ADNc) correspondiente a este péptido o proteína o un vector que contiene el ácido nucleico en una solución que contiene una enzima, un sustrato, un material energético, etc., necesarios para la transcripción y traducción para sintetizar el péptido o proteína deseado *in vitro*; recombinación de genes, es decir, un procedimiento que implica transferir el ácido nucleico o el vector a células procariotas o eucariotas (células huésped), cultivar las células recombinantes obtenidas y luego recuperar el péptido o proteína deseado del cultivo; o síntesis química.

En el caso donde la molécula diana sea una proteína presente o un dominio de la misma en una membrana celular, la molécula también se puede preparar como una proteína secretada expresando, en un sistema huésped-vector apropiado, una proteína de fusión que comprende la región extracelular de esta proteína o dominio unido a una región constante de inmunoglobulina (Ig).

El ácido nucleico correspondiente a la molécula diana puede obtenerse, por ejemplo, mediante un procedimiento de clonación de expresión, aunque el procedimiento de obtención no está limitado al mismo. El procedimiento de clonación de la expresión implica construir una biblioteca de expresión de ADNc que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de péptidos o proteínas, y realizar una reacción en cadena de la polimerasa (en adelante, "PCR"; Saiki, R.K., et al., Science (1988)), vol. 239, págs. 487-489) con esta biblioteca de ADNc como plantilla usando cebadores que amplifican específicamente la longitud total o parcial de los ADNc para clonar los ADNc correspondientes a los péptidos o proteínas.

Ejemplos de kits o reactivos aplicables a la traducción *in vitro* pueden incluir el Sistema de Traducción Rápida (RTS) fabricado por Roche Diagnostics K.K.

Las células procariotas o eucariotas aplicables como células huésped para preparar la célula de la presente divulgación pueden seleccionarse apropiadamente como las células huésped para la recombinación génica.

La célula recombinante (célula en la que se introduce el ácido nucleico o el vector) obtenida por recombinación génica puede cultivarse de acuerdo con un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica y puede permitirse que produzca el péptido o proteína deseado en el cultivo o dentro de la célula.

El medio para usar en este cultivo se puede seleccionar apropiadamente de entre aquellos usados rutinariamente de acuerdo con las células huésped. En el caso de usar células de *Escherichia coli* como células huésped, por ejemplo, un medio LB puede complementarse, si es necesario, con un antibiótico (por ejemplo, ampicilina) e IPTG y someterse al cultivo.

El péptido o proteína deseado producido intracelularmente o extracelularmente a partir de la célula recombinante por este cultivo puede purificarse y aislarse mediante la combinación apropiada de enfoques de fraccionamiento conocidos en la técnica usando, por ejemplo, sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas.

Ejemplos de metodología de fraccionamiento pueden incluir, pero no se limitan a, extracción con sal, tratamiento con un precipitante de proteína, diálisis, ultrafiltración, cromatografía por tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de partición y cromatografía hidrófoba.

Alternativamente, un resto útil para la purificación puede unirse o añadirse de antemano al péptido o proteína. Como resultado, el péptido o proteína deseado se puede purificar de manera eficiente. Por ejemplo, una etiqueta de histidina que consta de 6 residuos puede unirse de antemano al péptido o proteína para purificar eficientemente el péptido o proteína deseado por cromatografía de afinidad de níquel. Alternativamente, una región Fc de IgG se puede enlazar de antemano para purificar eficazmente el péptido o proteína deseado mediante cromatografía de afinidad de proteína A.

(3) Contacto del péptido y/o derivado peptídico con la molécula diana

El procedimiento de identificación de la presente invención comprende la etapa de poner en contacto péptidos y/o derivados de los mismos con la molécula diana. En este contexto, los péptidos de los mismos están contenidos en la biblioteca de péptidos. Específicamente, el procedimiento de identificación de la presente invención puede comprender la etapa de poner en contacto sus péptidos contenidos en la biblioteca de péptidos con la molécula diana.

- 5 En la presente invención, el término "contacto" significa que dos o más sustancias se acercan para que dos o más de estas sustancias puedan interactuar entre sí. Ejemplos de la interacción pueden incluir, entre otros: enlaces covalentes, enlaces coordinados, enlaces metal-metal, enlaces iónicos, enlaces metálicos, enlaces de hidrógeno y enlaces de Van der Waals (en adelante, estos enlaces se denominan "enlaces químicos"); interacciones basadas en interacciones electrostáticas tales como enlaces basados en la fuerza de Coulomb, interacciones interiónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares y de fuerzas de Van der Waals (en adelante, estas interacciones se denominan "fuerzas intermoleculares"); y otras interacciones, interacciones de transferencia de carga, interacciones transanulares, interacciones hidrófobas y asociación de péptidos y biomoléculas. En la presente invención, las "dos o más sustancias" no están particularmente limitadas siempre que las sustancias incluyan la molécula diana y una sustancia de prueba. La sustancia de prueba no está particularmente limitada siempre que la sustancia se una a la molécula diana. Ejemplos de las mismas pueden incluir el péptido de la presente divulgación, el derivado peptídico, un vehículo en fase sólida con el péptido o el derivado peptídico inmovilizado sobre el mismo, y una célula, una partícula viral o una partícula similar a un virus (incluyendo fagos y fagémidos) que expresan o presentan el péptido o el derivado peptídico. La sustancia de prueba puede expresarse o presentarse en la superficie de una célula eucariota o procariota, en una partícula viral o una partícula similar a un virus, o en una forma unida a ribosomas o ácido nucleico mediante presentación de fagos, presentación de ribosomas, presentación de ácidos nucleicos, o similares.

(4) Cribado

El procedimiento de identificación de la presente invención comprende la etapa de cribado de un péptido y/o un derivado peptídico que tiene propiedades deseadas, preferiblemente un péptido y/o un derivado peptídico que se une a la molécula diana.

- 25 En la presente invención, los términos "unión" o "unido" significan que dos o más sustancias están en proximidad o en un estado asociado entre sí en una determinada condición en la medida en que estas sustancias pueden interactuar (lo cual se describe en la otra parte de la presente divulgación) entre sí.

En la presente divulgación, las sustancias de prueba se ponen en contacto con moléculas diana bajo una determinada condición. Posteriormente, una sustancia de prueba adsorbida inespecíficamente a la molécula diana y una sustancia de prueba no unida o no adsorbida a la molécula diana se elimina de una fracción que contiene sustancia de prueba. Si una sustancia de prueba está presente en la fracción resultante, se puede considerar que esta sustancia de prueba se "une" a la molécula diana.

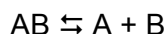
- 35 Cuando se produce una mera adsorción inespecífica entre dos o más sustancias, puede considerarse que la "unión" no se produce entre estas sustancias. Además, cuando dos o más sustancias en contacto entre sí no están en proximidad ni en un estado asociado entre sí en la medida en que estas sustancias puedan interactuar (lo cual se describe en la otra parte de la presente divulgación) entre sí, se puede considerar que la "unión" no se produce entre las sustancias.

Por ejemplo, un procedimiento con anticuerpos de fluorescencia (procedimiento directo o indirecto), radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático (procedimiento homogéneo o heterogéneo), ELISA o ELISPOT, que realiza el ensayo por citometría de flujo o similar, se usa ampliamente como procedimiento para determinar la "unión" entre un anticuerpo y un antígeno. En estos procedimientos, la presencia o ausencia de la "unión" entre el péptido o el derivado del mismo y la molécula diana se puede determinar de la misma manera que en la determinación de la "unión" entre un anticuerpo y un antígeno, excepto que el anticuerpo de prueba y el antígeno se reemplazan con el péptido de la presente divulgación o el derivado del mismo y la molécula diana.

- 45 Además, la presencia o ausencia de la "unión" se puede determinar midiendo un índice de actividad de unión o afinidad. Ejemplos del índice de afinidad de unión pueden incluir una constante de disociación y una constante de asociación.

Siempre que el equilibrio químico entre una molécula A y una sustancia B que se une a A se defina de la siguiente manera:

50 [Fórmula 1]



La constante de disociación (Kd) de la disociación química de la misma se puede calcular de acuerdo con la siguiente expresión:

$$K_d = [A][B] / [AB]$$

en la que [A], [B] y [AB] representan las concentraciones de la molécula A, la sustancia B y un conjunto AB, respectivamente; K_d representa la relación de la molécula A y la sustancia B disociada entre sí con respecto al conjunto AB no disociado; y el recíproco de K_d representa una asociación constante (K_a).

5 La "constante de disociación" usada en la presente divulgación significa principalmente la constante de disociación de equilibrio del péptido y/o el derivado peptídico para unirse a una determinada molécula diana.

En la presente divulgación, la constante de disociación se puede calcular midiendo las concentraciones de sustancias disociadas (péptido, derivado peptídico, molécula diana, etc.) y sustancias no disociadas (ensamblaje del péptido y/o el derivado peptídico y la molécula diana, etc.). El procedimiento para determinar y calcular la constante de disociación no está particularmente limitado siempre que el procedimiento sea bien conocido por los expertos en la materia.
10 Ejemplos de los mismos pueden incluir un procedimiento que utiliza resonancia de plasmón superficial y un procedimiento de calorimetría de titulación isotérmica.

En el procedimiento que usa resonancia de plasmón superficial, la interacción entre la molécula diana y el péptido y/o el derivado del mismo que se une a ella se puede determinar y calcular de la siguiente manera: se detecta una serie de reacciones de asociación y disociación mediante resonancia de plasmón superficial en una pluralidad de
15 concentraciones de péptidos; se analiza la serie obtenida de reacciones de asociación y disociación; y la constante de disociación se calcula a partir de diversas constantes de velocidad así obtenidas.

Ejemplos del sistema de cálculo de determinación de resonancia de plasmón superficial pueden incluir, pero no se limitan a, el sistema Biacore (GE Healthcare Japan Corp.). Los procedimientos para el procedimiento que utiliza el sistema Biacore son los siguientes: las moléculas diana se inmovilizan en un chip sensor del sistema Biacore mediante
20 acoplamiento de amina; las moléculas diana se ponen en contacto con péptidos en una pluralidad de concentraciones de péptidos; la interacción entre ellas se detecta por resonancia de plasmón superficial; se dibuja una serie de reacciones de asociación y disociación en un sensorgrama con el tiempo como abscisa contra la cantidad de unión (RU) como ordenada; el sensorgrama dibujado en la pluralidad de concentraciones de péptidos se ajusta a un modelo Langmuir 1:1 utilizando el software de evaluación BIA (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.) para calcular
25 diversos parámetros de velocidad; y la constante de disociación se calcula a partir de diversos parámetros de velocidad así calculados.

En el procedimiento de calorimetría de titulación isotérmica, la interacción entre la molécula diana y el péptido y/o el derivado del mismo que se une a la misma se puede determinar y calcular de la siguiente manera: se agrega una solución de péptido gota a gota a una solución que contiene molécula diana (o viceversa); la cantidad de calor
30 generado por la interacción se mide para dibujar una isoterma de unión; y se obtienen una constante de disociación (K_D), estequiometría de la reacción (N), un cambio de entalpía (ΔH) y un cambio de entropía (ΔS) a partir de la isoterma de unión.

Ejemplos del sistema de medición directa de un cambio térmico muy pequeño (cambio exotérmico o cambio endotérmico) asociado con una interacción intermolecular pueden incluir, entre otros, el sistema MicroCal (GE Healthcare Japan Corp.). Los procedimientos para el procedimiento que usa el sistema MicroCal son los siguientes: se titula una solución de ligando a cada celda de muestra mantenida a temperatura constante y se agita; la generación o absorción de calor directamente proporcional a la cantidad de unión tiene lugar a través de la interacción
35 intermolecular para cambiar la temperatura de la solución en la celda de muestra; una red de retroalimentación celular (CFB) detecta una diferencia de temperatura (ΔT) con una celda de referencia; la celda de referencia o la celda de muestra se calienta hasta que ΔT alcanza 0; se mide una potencia de retroalimentación requerida para mantener $\Delta T = 0$ para obtener la cantidad de calor generado o absorbido a través de la interacción; la cantidad de calor generado se representa como una ordenada contra la relación molar del péptido a la molécula diana como abscisa, y la constante de disociación se calcula a partir de la isoterma de unión.

En el procedimiento de identificación y/o el procedimiento de determinación (que se describirá más adelante) de la presente invención, una sustancia de prueba que exhibe una constante de disociación de, por ejemplo, 100 μM o menor, 50 μM o menor, 20 μM o menor, 10 μM o menor, 5 μM o menor, 2 μM o menor, 1 μM o menor, 500 nM (0,5 μM) o menor, 200 nM o menor, 100 nM o menor, 50 nM o menor, 20 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2 nM o menor, 1 nM o menor, 500 pM (0,5 nM) o menor, 200 pM o menor, 100 pM o menor, 50 pM o menor, 20 pM o menor, 10 pM o más pequeño, 5 pM o más pequeño, 2 pM o más pequeño, o 1 pM o más pequeño para la molécula
45 diana se puede determinar que se une a la molécula diana, es decir, que es positivo, aunque el valor de referencia de la constante de disociación y los criterios para determinar la presencia o ausencia de la "unión" no se limitan a los mismos.

En el procedimiento de identificación de la presente invención, el paso de "cribado" también sirve como el paso de recuperar la sustancia de prueba que se une a la molécula diana. El producto puede consistir solo en la sustancia de prueba que se une a la molécula diana o también puede contener una sustancia que no se une a la molécula diana siempre que la sustancia de prueba que se une a la molécula diana esté contenida o enriquecida en el producto. La sustancia de prueba de unión a molécula diana contenida o enriquecida en este producto puede ser una sola sustancia o puede ser una mezcla de dos o más de tales sustancias.
55

La etapa de cribado, es decir, la etapa de recuperación, en el procedimiento de identificación de la presente invención significa la etapa de recuperar una fracción que tiene la sustancia de unión a la molécula diana contenida o enriquecida en ella. Este paso no está particularmente limitado siempre que el paso se realice mediante un procedimiento de purificación por fraccionamiento bien conocido por los expertos en el campo técnico de la presente invención. El paso puede comprender, por ejemplo, los pasos de: separar una sustancia unida con la molécula diana, una sustancia no unida con la molécula diana y una sustancia adsorbida no específicamente a la molécula diana de la molécula diana (que contiene); o eluir la sustancia unida a la molécula diana (separando la sustancia de la molécula diana). En este paso, los criterios para determinar la constante de disociación o similares no tienen que establecerse para la presencia o ausencia de unión.

En la presente invención, el "cribado" incluido en el procedimiento de identificación de la presente invención también se denomina "barrido". En la presente invención, el "barrido" significa procedimientos para poner en contacto péptidos y/o derivados de péptidos de la presente divulgación con una molécula diana y recuperar (incluyendo el cribado, concentración y aislamiento) de un péptido y/o un derivado de péptido que se une a la molécula diana.

Un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica puede aplicarse al barrido. Ejemplos de los mismos pueden incluir, entre otros, un procedimiento de barrido en fase sólida y un procedimiento de barrido en fase líquida. El procedimiento de barrido en fase sólida puede implicar, por ejemplo, la inmovilización de moléculas diana en una fase sólida, poniendo en contacto posteriormente péptidos contenidos en una fase líquida con las moléculas diana, eliminando posteriormente un péptido no unido con la molécula diana y un péptido unido de forma inespecífica, y luego separando selectivamente un péptido unido con la molécula diana de (la molécula diana inmovilizada en) la fase sólida para detectar un péptido que tenga la actividad de unión deseada, aunque la operación del procedimiento de barrido en fase sólida no está limitado a esto. El procedimiento de barrido en fase líquida puede implicar, por ejemplo, poner en contacto péptidos con las moléculas diana en una solución, luego eliminar un péptido no unido con la molécula diana y un péptido unido no específicamente, y luego separar selectivamente un péptido unido con la molécula diana del objetivo para cribar un péptido que tenga la actividad de unión deseada, aunque la operación del procedimiento de barrido en fase líquida no se limita al mismo.

En el procedimiento de identificación de la presente invención, el ácido nucleico correspondiente al péptido (incluido incluso el "derivado peptídico") que se une a la molécula diana se criba de manera eficiente para usar una biblioteca en la que un fenotipo (sinónimo de un carácter fenotípico) está vinculado a un genotipo (sinónimo de carácter genético) correspondiente al mismo. Como resultado, el péptido se puede preparar de manera eficiente. El vínculo entre el fenotipo y el genotipo correspondiente (en lo sucesivo, simplemente denominado "fenotipo y genotipo") puede ser directo o indirecto.

El "enlace directo" entre el fenotipo y el genotipo significa que los comportamientos del fenotipo y el genotipo coinciden entre sí. Incluso si hay un grado de distancia entre el fenotipo y el genotipo, por ejemplo, debido a la presencia de un resto interviniente adicional, este caso también está incluido en el alcance del "enlace directo" siempre que sus comportamientos coincidan entre sí. Específicamente, no es esencial que sean físicamente adyacentes entre sí.

En la presente divulgación, la expresión "los comportamientos del fenotipo y el genotipo coinciden entre sí" significa que sus comportamientos coinciden entre sí en aspectos tales como el péptido, el ácido nucleico, el vector, la célula, el procedimiento de producción, el procedimiento de identificación, el procedimiento de determinación, la biblioteca de péptidos, la biblioteca de ácidos nucleicos, la composición y el reactivo como se describe en este documento. En estos aspectos, incluso si la "coincidencia de los comportamientos" se pierde total o parcialmente debido a un factor interno, un factor externo, su combinación o cualquiera de los otros factores a lo largo del tiempo, por el momento, hasta cierto punto en el tiempo, o desde cierto punto en el tiempo, este caso también se incluye en el alcance de la expresión "los comportamientos coinciden entre sí".

Ejemplos del enlace directo entre el fenotipo y el genotipo pueden incluir una biblioteca de presentación de ribosomas, una biblioteca de presentación de ácidos nucleicos, un péptido y/o un derivado del mismo unido directa o indirectamente al ácido nucleico correspondiente al péptido de la presente divulgación, y una biblioteca de péptidos que comprende este péptido y/o derivado del mismo.

El "enlace indirecto" entre el fenotipo y el genotipo significa que un fenotipo particular permite el acceso a un genotipo correspondiente al fenotipo, aunque sus comportamientos no siempre coinciden entre sí o no están necesariamente "directamente vinculados" uno con otro. Ejemplos del enlace indirecto entre el fenotipo y el genotipo pueden incluir, entre otros, una biblioteca de presentación de fagos y una biblioteca de ADNc para usar en la clonación de expresiones.

Aunque el comportamiento del péptido o el derivado del mismo como fenotipo no coincide necesariamente con el del ácido nucleico como un genotipo correspondiente al mismo, en cada clon contenido en la biblioteca de presentación de fagos o la biblioteca de ADNc, el péptido y/o el derivado del mismo (expresado o exhibido en una partícula similar a un fago) que se une a la molécula diana puede cribarse mediante los pasos, por ejemplo, de poner en contacto péptidos y/o derivados de los mismos contenidos en la biblioteca con la molécula diana, eliminando una partícula similar a un fago no unida con la molécula diana o adsorbida inespecíficamente a la molécula diana, y luego eluyendo selectivamente una partícula similar a un fago unida a la molécula diana. Además, el genotipo correspondiente, es

decir, el ácido nucleico correspondiente a este péptido o el derivado peptídico del mismo puede adicionalmente purificarse y aislarse y secuenciarse. Las ventajas de dicho acceso desde el fenotipo al genotipo correspondiente no se limitan al caso del "enlace indirecto" entre el fenotipo y el genotipo en la presentación en fago, etc., y también se pueden apreciar en el caso del "enlace directo" entremedio.

- 5 Cada paso incluido en el procedimiento de identificación de la presente invención puede realizarse repetidamente dos o más veces. En particular, se puede construir una nueva biblioteca de péptidos a partir de péptidos y/o derivados de péptidos recuperados en la etapa de cribado, y luego someterse a las etapas de contacto y cribado para enriquecer, en un nivel superior, la unión del péptido y/o el derivado del mismo a la molécula diana. Esta operación se puede repetir para enriquecer, a un nivel mucho más alto, el péptido y/o el derivado del mismo que se une a la molécula diana. Finalmente, se puede mejorar la eficiencia del aislamiento de los mismos. Además, este mayor nivel de enriquecimiento del péptido y/o el derivado del mismo que se une a la molécula diana logra el aislamiento de un aglutinante que tiene mayor afinidad.

- 10 Alternativamente, el péptido y/o el derivado del mismo que se une a la molécula diana se puede enriquecer a un nivel más alto separando de manera más segura el péptido unido a la diana y/o derivado del mismo de uno no específicamente unido en la etapa incluida en el procedimiento de identificación de la presente invención. Ejemplos de dicho procedimiento de separación incluyen el aumento en el número de la etapa de eliminación de un péptido unido de forma inespecífica, etc., y el cambio de un reactivo (tensioactivo, etc.) para su uso en la eliminación del péptido unido de forma inespecífica a uno más fuerte.

- 15 El péptido de la presente divulgación o el derivado del mismo puede tomar cualquier forma de un monómero, un homo o heterodímero, un trímero, un tetramero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero y un multímero compuesto de 9 o más monómeros.

- 20 El número de la molécula del péptido de la presente divulgación o el derivado del mismo que se une a una molécula diana o un sitio diana puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 o más. Este péptido o derivado del mismo puede unirse a la molécula diana, en cualquier forma de un monómero, un homo o heterodímero, un trímero, un tetramero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero y un multímero compuesto de 9 o más monómeros.

- 25 El número de la molécula diana o el sitio diana al que se une una molécula del péptido de la presente divulgación o el derivado del mismo puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 o más.

- 30 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para identificar un péptido o un derivado de péptido que active o promueva parcial o completamente o inhiba, inactive o suprima parcial o completamente la actividad biológica de una molécula diana, y un procedimiento para identificar un péptido o un derivado peptídico que agonice o antagonice una molécula diana. Específicamente, la presente divulgación proporciona un procedimiento para identificar un activador, un promotor o un agonista de una molécula diana o un inhibidor, un inactivador, un supresor o un antagonista de una molécula diana. Estos procedimientos de identificación pueden comprender cada uno los pasos (6-1) a (6-3), (7-1) a (7-3), o similares, aunque los procedimientos de identificación no se limitan a los procedimientos que comprenden estos pasos.

8. Composición

La presente divulgación proporciona una composición.

La composición de la presente divulgación comprende el péptido, el derivado de péptido, el ácido nucleico, el vector o la célula de la presente divulgación.

- 40 La composición que comprende el péptido de la presente divulgación o el derivado del mismo (incluidos los que se presentan en la superficie de la célula de la presente divulgación) puede usarse para detectar una molécula diana a la que se une el péptido o el derivado del mismo.

- 45 La composición que comprende el ácido nucleico, el vector o la célula de la presente divulgación se puede usar para preparar un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico, o el ácido nucleico contenido en el vector, o la célula de la presente divulgación. Además, esta composición puede usarse para detectar un ácido nucleico, un vector, una célula, etc., que contiene el ácido nucleico.

La composición puede comprender, si es necesario, por ejemplo, un tampón, una sal, un metal, un antiséptico, un tensioactivo y una sustancia para reducir o prevenir daños al péptido, el derivado peptídico, el ácido nucleico, el vector, o la célula de la presente divulgación por un procedimiento de preparación tal como congelación o liofilización.

9. Reactivo

La presente divulgación proporciona un reactivo.

El reactivo de la presente divulgación comprende el péptido, el derivado peptídico, el ácido nucleico, el vector o la célula de la presente divulgación.

El reactivo que comprende el péptido de la presente divulgación o el derivado del mismo puede usarse para detectar una molécula diana a la que se une el péptido o el derivado del mismo.

- 5 Por ejemplo, se sabe que las enzimas pancreáticas como la elastasa o la tripsina son sintetizadas por las células acinares pancreáticas y secretadas como un jugo pancreático en el sistema de conductos pancreáticos. Cuando se produce daño en el tejido pancreático debido a diversos estímulos inflamatorios o similares, estas enzimas se desvían en grandes cantidades hacia la sangre. Por lo tanto, se puede medir un aumento en el nivel de enzimas pancreáticas en la sangre para diagnosticar la presencia o ausencia de daño pancreático.

El reactivo que comprende el ácido nucleico, el vector o la célula de la presente divulgación puede usarse para detectar un ácido nucleico, un vector, una célula, etc., que contiene el ácido nucleico.

- 10 El reactivo de la presente divulgación puede ser una composición.

Un kit que comprende el reactivo también está incluido en el reactivo de la presente divulgación.

Además, el péptido o el derivado peptídico de la presente divulgación, la célula que presenta el péptido o el derivado peptídico, etc., puede usarse como un elemento que reconoce una sustancia tal como una molécula diana, en un biosensor para la sustancia.

15 10. Procedimiento de determinación

La presente divulgación proporciona incluso un procedimiento para determinar si una sustancia de prueba se une o no a una molécula diana. El procedimiento de determinación de la presente divulgación puede comprender, por ejemplo, los pasos mencionados anteriormente (5-1) y (5-2), aunque el procedimiento de determinación de la presente divulgación no se limita a los mismos.

- 20 El procedimiento de determinación de la presente divulgación puede emplear los mismos pasos que en los pasos incluidos en el procedimiento de identificación de la presente invención o pasos adecuadamente modificados a partir de estos pasos. Sin embargo, la sustancia de prueba, que está sujeta a este procedimiento de determinación, no tiene que estar contenida en una colección como una biblioteca. Por ejemplo, un péptido de prueba o un derivado de péptido de prueba sometido al procedimiento de determinación no se limita al péptido o al derivado de péptido contenido en la biblioteca de péptidos y puede ser un péptido único o un derivado de péptido separado de otros péptidos, una mezcla que los contiene, o similar. Específicamente, el procedimiento de identificación de la presente invención es adecuado principalmente como un procedimiento para identificar una o más moléculas que tienen propiedades deseadas de la colección física de sustancias de prueba, mientras que el procedimiento de determinación de la presente divulgación también es adecuado como un procedimiento de ensayo para examinar si o no una sustancia de prueba particular tiene las propiedades deseadas.

- 30 En el procedimiento de determinación de la presente divulgación, por ejemplo, la determinación en el paso de determinar si la sustancia de prueba se une o no a la molécula diana puede realizarse sobre la base de si la sustancia de prueba satisface o no las condiciones con respecto a un índice por afinidad como una constante de disociación. En la etapa de cribado, como en el procedimiento de identificación de la presente invención, se puede determinar que la sustancia de prueba es positiva si la sustancia de prueba se recupera como una sustancia que se une a la molécula diana.

- 35 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para determinar si la sustancia de prueba activa o promueve parcial o completamente o inhibe, inactiva o suprime parcial o completamente la actividad biológica de una molécula diana, y un procedimiento para determinar si la sustancia de prueba agoniza una molécula diana o antagoniza una molécula diana. Estos procedimientos de determinación de la presente divulgación pueden comprender cada uno los pasos (8-1) y (8-2), (9-1) y (9-2), o similares, aunque los procedimientos de determinación no se limitan a los procedimientos que comprenden estos pasos

Ejemplos

- 45 En lo sucesivo, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance técnico de la presente invención por ningún medio. Los plásmidos, las enzimas de restricción, las enzimas de modificación de ADN y similares utilizados en los Ejemplos de la presente invención están disponibles comercialmente y pueden usarse de acuerdo con procedimientos de rutina. Las operaciones utilizadas en la clonación de ADN, secuenciación de polinucleótidos, transformación de células huésped, cultivo de células transformadas, recolección de enzimas del cultivo resultante, purificación, etc., son bien conocidas por los expertos en la materia y pueden ser fácilmente conocidas por la literatura o similares.

[Ejemplo 1]

(1-1) Preparación de la biblioteca SPINK2 mutada aleatoriamente

Se construyeron vectores fagémidos para presentar una biblioteca SPINK2 mutada aleatoriamente en fagos. Primero, se sintetizó una región que contenía un terminador tTH para preparar el "fragmento 1 (SEQ ID NO: 10)". Se sintetizó

una región desde las posiciones de nucleótidos 2097 a 2232 (SEQ ID NO: 11) de pCANTAB 5E (GE Healthcare Japan Corp.) que contiene un operador lac para preparar el "fragmento 2". Una secuencia (SEQ ID NO: 12) que comprende una secuencia SD y un péptido de señalización phoA se sintetizó como "fragmento 3". La secuencia derivada de pCANTAB 5E de una proteína de recubrimiento de fago (gen III) se sintetizó como "fragmento 4". Se sintetizó una región que contenía un terminador lpp como "fragmento 5" (SEQ ID NO: 13). El "fragmento 1" al "fragmento 5" se usaron como plantillas para la PCR de extensión de solapamiento ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 160 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores 1 y 2 y KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.; que se compone de ADN polimerasa, una solución tampón, un sustrato, etc.): cebador 1: 5'-AAAAACGCGTCTGCGGCCGCATAGGGTAGCGAAACCT-3' Cebador 2: 5'-AAAAAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG-3'.

El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado se escindió y purificó con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega KK.) para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado y pCANTAB 5E se trataron cada uno con enzimas de restricción AflIII (New England Biolabs Japan Inc.) y NarI (New England Biolabs Japan Inc.) a 37 °C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados fueron escindidos y purificados con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C usando T4 ADN Ligasa (New England Biolabs Japan Inc.) para llevar a cabo la reacción de ligación. La solución de ligación se añadió a *Escherichia coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó en hielo durante 30 minutos, luego se trató con calor a 42 °C durante 45 segundos, y luego se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. La *Escherichia coli* se sembró sobre una placa 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y luego se transformó mediante cultivo estático durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, la *Escherichia coli* transformada se inoculó en un medio de caldo excelente (Invitrogen Corp.) que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y se cultivó durante una noche a 37 °C. Luego, el ADN de plasma se recuperó usando el kit QIAprep 96 Turbo Miniprep (Qiagen N.V.) (en adelante, esta operación se denomina "tratamiento miniprep"). El ADN obtenido fue secuenciado para confirmar que se construyó el vector de interés. Este vector se designó como un "vector fagémido pPR3".

El vector fagémido pPR3 se puede usar en los ejemplos descritos en el párrafo (1-3) o posterior, en lugar de un vector fagémido pPR3_SPINK2 (WT) construido en el párrafo (1-2).

(1-2) Construcción del vector fagémido pPR3_SPINK2(WT)

Los vectores fagémidos se construyeron para presentar una biblioteca SPINK2 mutada aleatoriamente en fagos. Primero, se preparó una región que contenía un terminador tTH como "fragmento 1" (SEQ ID NO: 10). Una región de las posiciones de nucleótidos 2099 a 2232 (correspondiente a las posiciones de nucleótidos 3 a 136 en la SEQ ID NO: 11) de pCANTAB 5E (GE Healthcare Japan Corp.) que contiene un operador lac se preparó como "fragmento 2". Se preparó una secuencia (SEQ ID NO: 12) que comprende una secuencia SD, un péptido de señalización phoA y una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SPINK2 de tipo salvaje, es decir, SPINK2(WT) como "fragmento 3". La secuencia derivada de pCANTAB 5E (desde las posiciones de nucleótidos 600 a 1848 en SEQ ID NO: 16) que contiene una proteína de recubrimiento de fago (gen III) se sintetizó como "fragmento 4". Se preparó una región que contenía un terminador lpp como "fragmento 5" (SEQ ID NO: 13). Se usó una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 16) que comprende el "fragmento 1" al "fragmento 5" como plantilla para la PCR de extensión de solapamiento ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 160 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores 1 y 2 y KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.; que se compone de ADN polimerasa, una solución tampón, un sustrato, etc.):

Cebador 1': 5'-AAAAGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCTCTCC-3'

Cebador 2': 5'-AAAAAGAATTCATTAAACGGCAGACAAAAAATGTCGC-3'

El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado se escindió y purificó con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega KK.) para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado y pCANTAB 5E se trataron cada uno con las enzimas de restricción SapI (New England Biolabs Japan Inc.) y EcoRI (New England Biolabs Japan Inc.) a 37 °C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados fueron escindidos y purificados con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C usando T4 ADN Ligase (New England Biolabs Japan Inc.) para llevar a cabo la reacción de ligación. La solución de ligación se añadió a *Escherichia coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó en hielo durante 30 minutos, luego se trató con calor a 42 °C durante 45 segundos, y luego se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. La *Escherichia coli* se sembró sobre una placa 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y luego se transformó mediante cultivo estático durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, la *Escherichia coli* transformada se inoculó en un medio de caldo excelente (Invitrogen Corp.) que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y se cultivó durante una noche a 37 °C. Luego, el ADN de plasma se recuperó usando el kit QIAprep 96 Turbo Miniprep (Qiagen N.V.) (en adelante, esta operación se denomina "tratamiento miniprep"). El ADN obtenido fue secuenciado para confirmar que se construyó el vector de interés. El vector construido se trató adicionalmente con una enzima de restricción EcoRI a 37 °C durante 1 hora o más. Después del tratamiento con Klenow, la reacción de ligación se llevó a cabo a 16 °C durante 1 hora usando T4 DNA Ligase (New England Biolabs Japan Inc.). Se transformó *Escherichia coli* JM109 con el producto de ligación. La *Escherichia coli* transformada se

cultivó y luego se sometió a tratamiento miniprep. El ADN obtenido fue secuenciado, y el vector construido se designó como un "vector fagémido pPR3_SPINK2 (WT)" y se usó en los siguientes ejemplos.

(1-3) Construcción del vector fagémido pPR3_relleno_TEV

- 5 A continuación, se insertó una secuencia de escisión de proteasa TEV y un relleno en el vector fagémido pPR3_SPINK2 (WT). Para preparar la secuencia de escisión de la proteasa TEV, se realizó una PCR de extensión solapada ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 10 segundos) × 30 ciclos) utilizando los siguientes cebadores 3 y 4 y KOD-plus-:

Cebador 3: 5'-GCGGCCGCATAGGGTAGCGAAAACCTGTATTTTCAGAG-3'

Cebador 4: 5'-GCTAAACAACCTTTCAACGGTgctaccGCTCTGAAAATACAGG-3'

- 10 El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado fue escindido y purificado con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System para preparar el ADN como "fragmento 6". El vector pPR3_SPINK2(WT) construido en el párrafo (1-2) se utilizó como plantilla para PCR ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 30 segundos) × 30 ciclos) utilizando los siguientes cebadores 5 y 6 y KOD-plus- para amplificar la proteína de la capa de fago (gen III):

- 15 Cebador 5: 5'-ACCGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCC-3'

Cebador 6: 5'-CATTAAAGCCAGAATGGAAAGCGCAGTC-3'

El fragmento de ADN amplificado se utilizó adicionalmente como plantilla para PCR ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 45 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores α y β y KOD-plus-:

- 20 Cebador α: 5'-AACACGCGTCTGCGGCCGCATAGGGTAGC-3'

Cebador β: 5'-AACGGATCCTCATTAAAGCCAGAATGGAAAG-3'

- El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado fue escindido y purificado con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado y pPR3_SPINK2(WT) construido en el párrafo (1-2) se trataron cada uno con las enzimas de restricción MluI (New England Biolabs Japan Inc.) y BamHI (New England Biolabs Japan Inc.) a 37 °C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados fueron escindidos y purificados con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16°C usando T4 DNA Ligase para llevar a cabo la reacción de ligación. Se transformó *Escherichia coli* JM109 con el producto de ligación. La *Escherichia coli* transformada se cultivó y luego se sometió a tratamiento miniprep. El ADN obtenido fue secuenciado. El vector construido se designó como un "vector fagémido pPR3_TEV". La operación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo (1-1).

- El vector fagémido construido pPR3_TEV y pcDNA3.1(+) (Invitrogen Corp.) se trataron cada uno con las enzimas de restricción EcoRI (New England Biolabs Japan Inc.) y MluI (New England Biolabs Japan Inc.) a 37 °C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados fueron escindidos y purificados con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16°C usando T4 ADN ligasa para llevar a cabo la reacción de ligación. Se transformó *Escherichia coli* JM109 con el producto de ligación. La *Escherichia coli* transformada se cultivó y luego se sometió a tratamiento miniprep. El ADN obtenido fue secuenciado. El vector construido se designó como un "vector fagémido pPR3_relleno_TEV". La operación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo (1-2).

- 40 (1-4) Preparación del vector fagémido SPINK2 mutado aleatoriamente

Para amplificar una región SPINK2 no mutada, se usó una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 14) que codifica la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humano como plantilla para PCR ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C por 30 segundos y 68 °C por 10 segundos) × 30 ciclos) usando los siguientes cebadores 7 y 8 y KOD-plus-:

Cebador 7: 5'-GGTAGCGATATGAGCACCTATGC-3'

- 45 Cebador 8: 5'-GCACGGACCATGCGAATA-3'

El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado fue escindido y purificado con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado se designó como inserto A.

- 50 A continuación, se sintetizó cada oligonucleótido SPINK2 que comprende una región aleatoria (región correspondiente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias).

5'-GC AAA TAT CGT ACC CCG AAT TGT UUU UUU UUU UUU UUU VVV UUU TGT VVV UUU UUU WWW XXX CCG GTT GGT AGC GAT ATG-3'

UUU, VVV, WWW y XXX representan cada una de las bases seleccionadas entre A, T, G y C.

5 UUU incluye codones que codifican 18 aminoácidos (Ala, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Trp, Arg, Lys, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Ser, Met, Gly y Thr) excepto Cys y Pro.

VVV incluye codones que codifican 19 aminoácidos (Ala, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Trp, Arg, Lys, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Ser, Met, Gly, Thr y Pro) excepto Cys.

WWW incluye codones que codifican Tyr, Ser, Phe, Leu y Thr.

XXX incluye codones que codifican Asn, Asp, Leu, Lys, Gln, Ala y Glu.

10 El inserto A y el oligonucleótido SPINK2 se usaron como plantilla para PCR ((95°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos) × 10 ciclos) usando los siguientes cebadores) 9 y 10 y PfuUltra II Fusion HS ADN Polymerase (Agilent Technologies, Inc.):

Cebador 9: 5'-GTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGT-3'

Cebador 10: 5'-GCACGGACCATTGCGAATA-3'

15 El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado fue escindido y purificado con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado se designó como el inserto B. El inserto B se usó además como plantilla para PCR ((95 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos) × 10 ciclos) usando los siguientes cebadores 11 y 12 y PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase:

20 Cebador 11: 5'-AAAGAATTCTGATCCGCGAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATAATCGT-3'

Cebador 12: 5'-AAAGGCGCGCCGACGGACCATTGCGAATAATTTTAAT-3'

25 El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado fue escindido y purificado con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado se designó como el inserto C. El inserto C se trató con las enzimas de restricción EcoRI (New England Biolabs Japan Inc.) y AclI (New England Biolabs Japan Inc.) a 37 °C durante 5 horas o más, mientras que el vector fagémido pPR3_relleno_TEV se trató con EcoRI (Takara Bio Inc.) y MluI (Takara Bio Inc.) de la misma manera que anteriormente. El inserto C se purificó usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. El vector fagémido se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado se cortó y purificó con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega KK.). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C usando T4 ADN Ligase (New England Biolabs Japan Inc.) para llevar a cabo la reacción de ligación. Al día siguiente, el producto de ligación se trató térmicamente a 65 °C durante 10 minutos. El ADN fue desalado usando Amicon-Ultra (30k; Merck Millipore).

(1-5) Preparación de *Escherichia coli* XL1-Blue con el vector fagémido SPINK2 mutado aleatoriamente

35 A continuación, se prepararon células competentes para su uso en transformación. XL1-Blue (Stratagene Corp.) cultivado durante la noche del día anterior a 37 °C usando un medio 2-YT (Invitrogen Corp.) se inoculó en un medio 2-YT y se cultivó a 37 °C durante algunas horas. Después de enfriar con hielo, el sedimento se recuperó por centrifugación (3.000 g, 10 min., 4 °C) y se suspendió en agua estéril, seguido de centrifugación. El sedimento se suspendió adicionalmente en glicerol al 10 % y luego se centrifugó. El sedimento se resuspendió en glicerol al 10 % y luego se centrifugó. Finalmente, el sedimento se suspendió en glicerol al 10 % para preparar células competentes.

40 El ADN preparado en el párrafo (1-4) y las células competentes se usaron en transformación por electroporación (1,97 kV, 186 µF). Luego, las células se cultivaron con agitación a 37 °C durante 1 hora usando un medio SOC, luego se colocaron en placas sobre una placa 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y glucosa al 2 % (Nacalai Tesque, Inc.), y cultivadas estáticamente a 30 °C. Al día siguiente, las colonias se recuperaron utilizando una solución de 2-YT que contenía glucosa al 1 % y glicerol al 15 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se almacenaron a -80 °C. Además, se recogió una porción de la solución de cultivo después de la electroporación, se sembró en placa después de una dilución en serie y se cultivó estáticamente. Al día siguiente, se midió el número de colonias para estimar el tamaño de la biblioteca. Se confirmó que la biblioteca construida tenía un tamaño de aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ fagos.

(1-6) Construcción de la biblioteca de fagos SPINK2 mutada aleatoriamente

50 Las colonias de *Escherichia coli* construidas en el párrafo (1-5) se inocularon en un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y glucosa al 1 % para preparar una suspensión de *Escherichia coli* con $OD_{600\text{ nm}} = 0,3$. Las células bacterianas se cultivaron con agitación a 37 °C y, por lo tanto, se dejaron crecer hasta $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$. A esto se añadió

una cantidad suficiente de un fago auxiliar VCSM13 (Stratagene Corp.). Las células se dejaron reposar a 37 °C durante 30 minutos y se cultivaron por agitación adicional a 37 °C durante 30 minutos. Luego, las células se dejaron reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sedimento se recuperó por centrifugación (3.000 g, 20 min., 4 °C), luego se suspendió en un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml, kanamicina 30 µg/ml (Nacalai Tesque, Inc.) y IPTG 0,25 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y se cultivaron con agitación durante la noche a 22 °C.

Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo se recuperó por centrifugación (9.000 g, 20 min., 4 °C). A esto se añadió una solución que contenía 20 % de polietilenglicol 6000 (Nacalai Tesque, Inc.) y NaCl 2,5 M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 1/4 de la cantidad del sobrenadante del cultivo, y la mezcla se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos para precipitar partículas de fago (en adelante, esta operación se denomina "precipitación de PEG"). Los fagos precipitados por dos ciclos repetitivos de precipitación de PEG y centrifugación (9.000 g, 30 min., 4 °C) se suspendieron en PBS para preparar una biblioteca de fagos SPINK2 mutada aleatoriamente.

La *Escherichia coli* XL1-Blue se infectó con la solución de fago preparada y se sembró sobre una placa 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y glucosa al 1 %. Se midió el número de colonias formadas. La biblioteca de fagos tenía un título de $1,8 \times 10^{13}$ fagos/ml.

[Ejemplo 2]

Cribado de la unión del mutante SPINK2 a la molécula diana

(2-1) Procedimiento de barrido en fase líquida

Cada proteína diana descrita en (2-4) se biotiniló usando el Reactivo de Biotina Cromogénico EZ-Link NHS (Thermo) de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

La proteína diana biotinilada se mezcló con fagos que presentan mutantes SPINK2 y se hizo reaccionar durante 1 a 12 horas. Al producto de reacción, se añadieron estreptavidina Dynabeads M-280 (Invitrogen Corp.) (en lo sucesivo, simplemente denominadas "perlas") para unir la proteína diana biotinilada a las perlas. Las perlas se lavaron una cantidad predeterminada de veces con PBS que contenía Tween al 0,05 % (en lo sucesivo, "PBS-T") y luego reaccionaron con la Proteasa AcTEV(TM) (Invitrogen Corp.) durante 30 minutos para recuperar un fago que presenta mutante SPINK2 unido con la proteína diana biotinilada en la superficie de las perlas. *Escherichia coli* XL1-Blue fue infectada por el fago recuperado, luego sembró sobre una placa 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y glucosa al 1 %, y se cultivó durante la noche a 30 °C. La biblioteca de fagos SPINK2 mutada aleatoriamente se usó en la primera ronda de barrido en fase líquida, y los fagos preparados a partir de colonias de *Escherichia coli* obtenidas en la ronda anterior se usaron en la segunda ronda o posteriores.

(2-2) Procedimiento de barrido en fase sólida

Se añadió una cantidad dada de cada proteína diana a una placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc Maxisorp (Nunc) y se dejó reposar durante la noche a 4°C para la inmovilización en fase sólida en la placa. Además, se añadió una cantidad dada de cada proteína diana a la resina seca de agarosa activada por NHS de Pierce (Thermo Fisher Scientific K.K.) y se inmovilizó en agarosa de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

La placa o agarosa inmovilizada con proteína diana se mezcló con fagos que presentaban mutantes SPINK2 y se hizo reaccionar durante 1 a 12 horas. Al producto de reacción, se añadieron perlas para unir la proteína diana biotinilada a las perlas. Las cuentas se lavaron tiempos predeterminados con PBS-T y luego se hicieron reaccionar con Proteasa AcTEV (TM) (Invitrogen Corp.) durante 30 minutos para recuperar un fago que presenta mutantes SPINK2 unido con la proteína diana biotinilada en la superficie de las cuentas. *Escherichia coli* XL1-Blue fue infectada por el fago recuperado, luego sembró sobre una placa 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y glucosa al 1 %, y se cultivó durante la noche a 30 °C. La biblioteca de fagos SPINK2 mutada aleatoriamente se usó en la primera ronda de barrido en fase sólida, y los fagos preparados a partir de colonias de *Escherichia coli* obtenidas en la ronda anterior se usaron en la segunda ronda o posteriores.

(2-3) Preparación del fago

Las colonias de *Escherichia coli* obtenidas después del cribado se inocularon en un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y glucosa al 1 % para preparar una suspensión de *Escherichia coli* con $OD_{600\text{ nm}} = 0,3$. Las células bacterianas se cultivaron con agitación a 37 °C y, por lo tanto, se dejaron crecer hasta $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$. A esto se añadió una cantidad suficiente de un fago auxiliar VCSM13 (Stratagene Corp.). Las células se dejaron reposar a 37 °C durante 30 minutos y se cultivaron por agitación adicional a 37 °C durante 30 minutos. Luego, las células se dejaron reposar sobre hielo durante 30 minutos. El sedimento se recuperó por centrifugación (3.000 g, 20 min., 4 °C), luego se suspendió en un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml, kanamicina 30 µg/ml (Nacalai Tesque, Inc.) e IPTG 0,25 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y se cultivaron con agitación durante la noche a 22 °C. Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo se recuperó por centrifugación. Se preparó una solución de fago mediante dos ciclos repetitivos de precipitación con PEG y centrifugación.

(2-4) Cribado del mutante SPINK2 que se une a la molécula diana

Se llevaron a cabo de tres a cinco rondas de barrido en fase líquida o en fase sólida usando cualquiera de los siguientes 4 tipos de proteínas diana:

Quimotripsina (Worthington Biochemical Corp.)

Calicreína de plasma humano recombinante (R&D Systems, Inc.)

5 EGFR/Fc humano recombinante (R&D Systems, Inc.; en lo sucesivo denominado "EGFR/Fc")

ErbB2/Fc humano recombinante (R&D Systems, Inc.; en lo sucesivo denominado "HER2/Fc")

(2-5) Evaluación de la actividad de unión del mutante SPINK2 (policlón) contra la proteína diana

Los fagos que presentan mutantes SPINK2 se prepararon a partir de las colonias de *Escherichia coli* después del barrido de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo (2-3).

10 Cada proteína diana descrita en el párrafo (2-4) o una albúmina de suero bovina libre de proteasa libre de IgG-control negativa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; en lo sucesivo, denominada "BSA") se añadió a Nunc Maxisorp placa de 96 pocillos de fondo plano (Nunc). La placa de 96 pocillos se dejó en reposo durante la noche a 4 °C y, como consecuencia, se revistió con la proteína. A continuación, los fagos que presentan mutantes SPINK2 preparados a partir de las colonias de *Escherichia coli* después del barrido se añadieron a la misma como muestra, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, la muestra se retiró y la placa se lavó con PBS-T.

15 Luego, se añadió al mismo conjugado monoclonal HRP/Anti-M13 (GE Healthcare Japan Corp.), y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se eliminó el conjugado monoclonal HRP/Anti-M13, y la placa se lavó con PBS-T. Luego, se desarrolló color utilizando el sustrato kit POD A.B.T.S. (Nacalai Tesque, Inc.). La absorbancia se midió a una longitud de onda de medición de 405 nm. La muestra y el conjugado monoclonal HRP/Anti-M13 se diluyeron cada uno usando PBS-T.

20

Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 4. ELISA demostró que los mutantes SPINK2 (policlones) que exhiben actividad de unión específica al objetivo se enriquecieron a partir de la biblioteca SPINK2 mutada aleatoriamente mediante el barrido contra cada proteína diana.

[Ejemplo 3]

25 Evaluación del péptido de unión a α -quimotripsina (clon único)

(3-1) Construcción de pET 32a (variada)

pIRES Puro3 (Clontech Laboratories, Inc.) se utilizó como plantilla para PCR ((94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 30 segundos) $\times$ 30 ciclos) usando los siguientes cebadores 13 y 14 y KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.):

30 5'-AAAGGATCCGCGAATTCATGACCGAGTACAAGCCAC-3'

5'-AAACTCGAGTTATGCGGCCGCTCAGGCACCGGGCTTGCGG-3'

El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Luego, el fragmento de ADN deseado se escindió y purificó con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega KK.) para preparar el ADN. El fragmento de ADN preparado y pET 32a(+) (Novagen, Merck KGaA) se trataron cada uno con las enzimas de restricción BamHI (Takara Bio Inc.) y XhoI (Takara Bio Inc.) a 37 °C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se cortaron y purificaron con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega KK). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16°C usando T4 DNA Ligase para llevar a cabo la reacción de ligación. *Escherichia coli* JM109 se transformó con el producto de ligación. La *Escherichia coli* transformada se cultivó, seguida de tratamiento miniprep y secuenciación para construir "pET 32a (variado)". La operación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo (1-2).

35

40

(3-2) Expresión del péptido de unión a α -quimotripsina en *Escherichia coli* Origami B (DE3) y su purificación

Se recuperó un vector fagémido de las colonias de *Escherichia coli* después del barrido usando el kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen N.V.) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. El vector recuperado y pET 32a (variado) se trataron cada uno con las enzimas de restricción EcoRI (Takara Bio Inc.) y NotI (Takara Bio Inc.) a 37 °C durante 1 hora o más.

45 Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se cortaron y purificaron con Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega KK). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C usando T4 DNA Ligase (New England Biolabs Japan Inc.) para llevar a cabo la reacción de ligación. *Escherichia coli* JM109 se transformó con el producto de ligación. La operación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo (1-2). *Escherichia coli* Origami B (DE3) (Novagen, Merck KGaA) se transformó con un plásmido recuperado usando Miniprep y sembró sobre una placa de 2 YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml.

50

Posteriormente, las colonias obtenidas se inocularon en un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y se cultivaron durante la noche a 37°C. Luego, una porción de la solución de cultivo se inoculó nuevamente en un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml y se cultivó hasta $OD_{600\text{ nm}} =$ aproximadamente 1. Luego, se añadió IPTG (concentración final: 1 mM). La expresión de proteínas fue inducida por un cultivo nocturno a 16 °C. Al día siguiente, las células bacterianas se recogieron por centrifugación (3.000 g, 20 min., 4 °C). Luego, se añadió a ello BugBuster Master Mix (Novagen, Merck KGaA), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió resina de afinidad metálica TALON (Takara Bio Inc.) a un sobrenadante recuperado por centrifugación (10.000 g, 20 min., 4 °C), y la mezcla se agitó a 4 °C durante 1 hora o más para adsorber la proteína de fusión His-tag de interés sobre la resina. La resina se lavó varias veces con una solución tampón de fosfato de sodio (fosfato de sodio 50 mM y NaCl 300 mM, pH 7,4). Luego, se añadió una solución de elución (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 150 mM, pH 7,4) para recuperar la proteína de fusión de la etiqueta His. Además, la etiqueta de tiorredoxina se escindió usando el kit de captura de escisión de trombina (Novagen, Merck KGaA). La etiqueta de tiorredoxina se eliminó mediante la adición a TALON. Finalmente, la proteína de interés se concentró y se reemplazó con tampón con PBS usando Amicon-Ultra (3k). La proteína de interés preparada (mutante SPINK2) se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para analizar su estado molecular.

Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. Todos los clones exhibieron una única banda en condiciones reductoras y no reductoras, lo que demuestra que el estado molecular de la proteína de interés así expresada y purificada estaba compuesta principalmente de un monómero.

(3-3) Evaluación de la afinidad de unión al objetivo del péptido de unión a α -quimotripsina expresado en *Escherichia coli* y purificado

La evaluación se realizó mediante ELISA para confirmar la especificidad de unión al objetivo de cada mutante SPINK2 (aglutinante de α -quimotripsina) preparado en el párrafo (3-2). La proteína diana quimotripsina se añadió a una placa Nunc Maxisorp de fondo plano de 96 pocillos. La placa de 96 pocillos se dejó en reposo durante la noche a 4 °C y, como consecuencia, se revistió con la proteína. A continuación, el mutante SPINK2 preparado en el párrafo (3-2) se añadió a la misma como muestra, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, la muestra se retiró y la placa se lavó con PBS-T. Luego, se añadió a la misma conjugado HRP purificado por afinidad de anticuerpos S-Tag (Bethyl Laboratories, Inc.), y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se eliminó la solución de anticuerpo de detección y la placa se lavó con PBS-T. Luego, el color se desarrolló utilizando el sustrato Kit POD A.B.T.S.. La absorbancia se midió a una longitud de onda de medición de 405 nm. La muestra y el HRP purificado por afinidad de anticuerpos S-Tag conjugados se diluyeron cada uno usando PBS-T.

Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Todos los mutantes SPINK2 preparados usando *Escherichia coli* tenían actividad de unión contra el objetivo. Además, ELISA mostró una curva sigmoidea. A partir del valor más bajo de la intensidad de la señal y la respuesta máxima detectada en ELISA, se calculó una concentración que exhibía el 50 % de la respuesta máxima, es decir, EC50, para confirmar que la EC50 de la actividad de unión era 18,3 nM en el péptido No. 2 (clon 2) y 17,8 nM en el péptido No. 6 (clon 6).

(3-4) Evaluación de la especificidad diana del péptido de unión a α -quimotripsina expresado en *Escherichia coli* y purificado

La proteína diana quimotripsina o una tripsina de control negativo (Pierce Biotechnology Inc.) se añadió a una placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc Maxisorp. La placa de 96 pocillos se dejó en reposo durante la noche a 4 °C y, como consecuencia, se revistió con la proteína. A continuación, cada mutante SPINK2 preparado en el párrafo (3-2) se añadió a la misma como muestra, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, la muestra se retiró y la placa se lavó con PBS-T. Luego, se añadió a la misma S-Tag Antibody Affinity Purified HRP conjugado, y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se eliminó la solución de anticuerpo de detección y la placa se lavó con PBS-T. Luego, se desarrolló el color usando el sustrato Kit POD A.B.T.S.. La absorbancia se midió a una longitud de onda de medición de 405 nm. La muestra y el S-Tag Antibody Affinity Purified HRP conjugados se diluyeron cada uno usando PBS-T.

Los resultados se muestran en las Figuras 9 y 10. Los péptidos Nos. 2 y 6 (clones 2 y 6) no exhibieron reactividad con la tripsina y exhibieron una fuerte reactividad con la proteína diana quimotripsina. Por lo tanto, se encontró que estos péptidos tenían una unión específica a la diana.

(3-5) Evaluación de la actividad inhibidora de quimotripsina del péptido de unión a α -quimotripsina expresado en *Escherichia coli* y purificado

La actividad inhibitoria de cada mutante SPINK2 preparado en el párrafo (3-2) contra la proteína quimotripsina diana se cuantificó usando el Pierce Quantitative Protease Assay Kit. La operación se realizó de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

Los resultados se muestran en la Figura 11. Los péptidos Nos. 2 y 6 (clones 2 y 6) exhibieron actividad inhibitoria y tenían una IC50 de 815 nM y 374 nM, respectivamente.

(3-6) Secuenciación del péptido de unión a α -quimotripsina

Cada mutante SPINK2 (péptido de unión a α -quimotripsina) que exhibió actividad de unión contra quimotripsina en el párrafo (3-3) fue secuenciado. La *Escherichia coli* Origami B (DE3) transformada con un gen de cada mutante SPINK2 se cultivó durante la noche a 37 °C usando un medio 2-YT que contenía ampicilina a 0,1 mg/ml. Al día siguiente, el ADN de plasma se recuperó del cultivo usando el kit QIAprep 96 Turbo Miniprep. El ADN de plasma se usó como plantilla en el análisis de secuencia de nucleótidos usando un cebador 15 que tiene la siguiente secuencia de nucleótidos:

5'-GTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATC-3'

Los resultados de analizar regiones aleatorizadas (regiones aleatorias) se muestran en la Figura 12. Las regiones aleatorizadas en todos los mutantes SPINK2 fueron codificadas por diferentes secuencias de nucleótidos.

Aplicabilidad industrial

La biblioteca de péptidos de la presente invención se puede usar para buscar péptidos que se unan a diversas moléculas diana y es útil en la investigación de agentes de prueba, fármacos para diagnóstico, etc. Además, el péptido que se une a una molécula diana predeterminada es útil como agente de prueba, fármaco para diagnóstico o similar.

Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido que tiene diversidad (Figura 13)

SEQ ID NO: 2 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 1)

SEQ ID NO: 3 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 2)

SEQ ID NO: 4 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 6)

SEQ ID NO: 5 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 7)

SEQ ID NO: 6 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 12)

SEQ ID NO: 7 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 13)

SEQ ID NO: 8 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 14)

SEQ ID NO: 9 en el Listado de secuencias - Región aleatoria del péptido de unión a quimotripsina (Figura 12; péptido No. 17)

SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias - Fragmento 1 (Figura 14)

SEQ ID NO: 11 en el Listado de Secuencias - Fragmento 2 (subrayado en la Figura 15)

SEQ ID NO: 12 en el Listado de Secuencias - Fragmento 3 (Figura 16)

SEQ ID NO: 13 en el Listado de Secuencias - Fragmento 5 (Figura 17)

SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias - Secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SPINK2 (Figura 18)

SEQ ID NO: 15 en el Listado de Secuencias - Secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 16 en el Listado de Secuencias - Secuencia de nucleótidos del ADN molde para PCR que comprende los fragmentos 1 a 5

Listado de secuencias

<110> Daiichi Sankyo Co., Ltd.

<120> Biblioteca de péptidos y usos de la misma

<130> FP1328

<150> 2012-176208

<151> 2012-08-08

<160> 16

<170> PatentIn version 3,5

5 <210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Péptido con diversidad

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (2)..(8)

<223> cualquier aminoácido

15 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISC

<222> (10)..(14)

<223> cualquier aminoácido

<400> 1

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Val
1				5					10						15	

20 **Cys**

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Péptido No. 1 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 2

Cys	Arg	Thr	Arg	Trp	Gly	Asn	Arg	Cys	Thr	Trp	Gln	Tyr	Lys	Pro	Val
1				5				10						15	

Cys

<210> 3

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido No. 2 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 3

Cys	Met	Arg	His	Arg	Arg	His	Phe	Cys	Thr	Met	Val	Tyr	Lys	Pro	Val
1				5					10					15	

5 **Cys**

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Péptido No. 6 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 4

Cys	Arg	Arg	Trp	Leu	Leu	Pro	Trp	Cys	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Pro	Val
1				5					10					15	

Cys

<210> 5

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido No. 7 de unión a alfa-quimotripsina

20 <400> 5

Cys	Leu	Trp	Arg	Arg	His	Lys	Leu	Cys	Pro	Phe	Lys	Phe	Lys	Pro	Val
1				5					10					15	

Cys

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido No. 12 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 6

Cys Trp Arg Ser Trp Arg Trp Ala Cys Pro Tyr Met Tyr Lys Pro Val
1 5 10 15

Cys

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido No. 13 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 7

Cys Trp Phe Phe Arg Trp Arg Trp Cys Asn Trp Ala Leu Lys Pro Val
1 5 10 15

Cys

10 <210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido No. 14 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 8

Cys Ser Thr Trp Arg Met Trp Gly Cys Pro Trp Leu Tyr Lys Pro Val
1 5 10 15

Cys

<210> 9

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido No. 17 de unión a alfa-quimotripsina

<400> 9

Cys Trp Arg Arg Trp Tyr Asp Arg Cys Ser Phe Asn Leu Lys Pro Val
1 5 10 15

25 **Cys**

<210> 10
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Fragmento 1
 <400> 10
 gtaccgata aaagcggtt cctgacagga ggccgtttg tttgcagcc cacct 55
 <210> 11

10 <211> 136
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 2

15 <400> 11
 cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattagggcac cccaggcttt acactttatg 60
 cttccggctc gtatgttgtg tgggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc 120
 tatgaccatg attacg 136
 <210> 12
 <211> 309
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Fragmento 3
 <400> 12
 aatttctaga taacgagggc aaatcatgaa acaaagcact attgcactgg cactcttacc 60
 gttgctgttt acccctgtga cgaaagctgc tagcgcgaat tctgatccgc agtttggtct 120
 gtttagcaaa tatcgtaccc cgaattgtag ccagtatcgt ctgcctgggt gtccgcgtca 180
 ttttaatccg gtttgtggta gogatatgag cacctatgca aatgaatgta ccctgtgcat 240
 gaaaattcgt gaagggtggcc ataataattaa aattattcgc aatgggtccgt gcgacgcgtc 300
 tgcggccgc 309

25 <210> 13
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento 5

<400> 13

ctgtgaagtg aaaaatggcg cacattgtgc gacattttt ttgtctgccg ttaatc 57

5 <210> 14

<211> 192

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(192)

<400> 14

gat	ccg	cag	ttt	ggg	ctg	ttt	agc	aaa	tat	cgt	acc	ccg	aat	tgt	agc	48
Asp	Pro	Gln	Phe	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Arg	Thr	Pro	Asn	Cys	Ser	
1				5					10					15		

cag	tat	cgt	ctg	cct	ggg	tgt	ccg	cgt	cat	ttt	aat	ccg	gtt	tgt	ggg	96
Gln	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Phe	Asn	Pro	Val	Cys	Gly	
			20					25					30			

agc	gat	atg	agc	acc	tat	gca	aat	gaa	tgt	acc	ctg	tgc	atg	aaa	att	144
Ser	Asp	Met	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asn	Glu	Cys	Thr	Leu	Cys	Met	Lys	Ile	
		35					40					45				

cgt	gaa	ggg	ggc	cat	aat	att	aaa	att	att	cgc	aat	ggg	ccg	tgc	taa	192
Arg	Glu	Gly	Gly	His	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Arg	Asn	Gly	Pro	Cys		
	50					55					60					

<210> 15

15 <211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp	Pro	Gln	Phe	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Arg	Thr	Pro	Asn	Cys	Ser
1				5					10					15	

Gln	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Phe	Asn	Pro	Val	Cys	Gly
			20					25					30		

Ser	Asp	Met	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asn	Glu	Cys	Thr	Leu	Cys	Met	Lys	Ile
		35					40					45			

Arg	Glu	Gly	Gly	His	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Arg	Asn	Gly	Pro	Cys
	50					55					60			

20 <210> 16

<211> 1916

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una plantilla de ADN para PCR que comprende los fragmentos 1 a 5

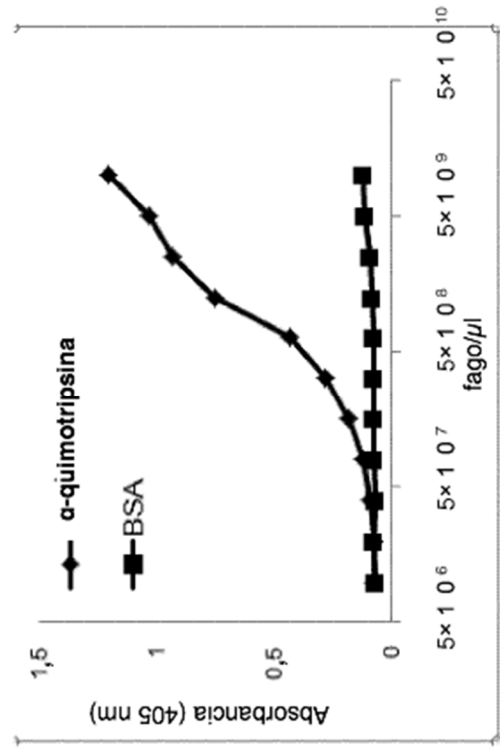
<400> 16

gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc	60
tggcacgaca ggtttcccgga ctggaaagcg ggcagtgage ggtacccgat aaaagcggct	120
tcctgacagg aggcgcgtttt gttttgcagc ccacctcaac gcaattaatg tgagttagct	180
cactcattag gcaccccagg cttttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat	240
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aatttctaga	300
taacgagggc aaatcatgaa acaaagcact attgcactgg cactcttacc gttgctgttt	360
acccctgtga cgaaagctgc tagcgcgaat tctgatccgc agtttggtct gtttagcaaa	420
tatcgtaccc cgaattgtag ccagtatcgt ctgcctgggt gtccgcgtca ttttaatccg	480
gtttgtggtg gcgatatgag cacctatgca aatgaatgta ccctgtgcat gaaaattcgt	540
gaaggtggcc ataataattaa aattattcgc aatggctcgt gcgacgcgtc tgcggccgca	600
taggcaggtg catctggcgg tggttctggc gcaaccgttg aaagtgttt agcaaaaccc	660
catacagaaa attcatttac taacgtctgg aaagacgaca aaactttaga tcgttacgct	720
aactatgagg gctgtctgtg gaatgctaca ggcgttgtgg tttgtactgg tgacgaaact	780
cagtgttacg gtacatgggt tcctattggg cttgctatcc ctgaaaatga ggggtggggc	840
tctgaggggt gcggttctga ggggtggcgg tctgaggggt gcggtactaa acctcctgag	900
tacggtgata cacctattcc gggctatact tataatcaacc ctctcgacgg cacttatccg	960
cctgggtactg agcaaaaccc cgctaactct aatccttctc ttgaggagtc tcagcctctt	1020
aatactttca tgtttcagaa taatagggtc cgaaataggc aggggtgcatt aactgtttat	1080
acgggcactg ttactcaagg cactgacccc gttaaaaactt attaccagta cactcctgta	1140
tcatcaaaaag ccattgtatga cgcttactgg aacggtaaat tcagagactg cgctttccat	1200
tctggcttta atgaggatcc attcgtttgt gaatatcaag gccaatcgtc tgacctgcct	1260
caacctcctg tcaatgctgg cggcggctct ggtggtgggt ctggtggcgg ctctgaggg	1320
ggcggctctg aggggtggcg tttctgaggg ggcggctctg aggggtggcg ttcgggtggc	1380
ggctccgggt ccgggtgattt tgattatgaa aaaatggcaa acgctaataa gggggctatg	1440
accgaaaatg ccgatgaaaa cgcgctacag tctgacgcta aaggcaaaact tgattctgtc	1500
gctactgatt acgggtgctgc tatcgatggg ttcatlggtg acgtttccgg ccttgctaata	1560
ggtaatggtg ctactggtga ttttgctggc tctaattccc aaatggctca agtcgggtgac	1620
ggtgataaatt cacctttaat gaataatttc cgtcaatatt taccttcttt gcctcagtcg	1680
gttgaatgtc gcccttatgt ctttggcgct ggtaaaccat atgaattttc tattgattgt	1740
gacaaaataa acttattccg tgggtgtcttt gcgtttcttt tatatgttgc cacctttatg	1800
tatgtatttt cgacgtttgc taacatactg cgtaataagg agtccttaata gtacctgtga	1860
agtgaaaaat ggcgcacatt gtgcgacatt tttttgtct gccgtttaat gaattc	1916

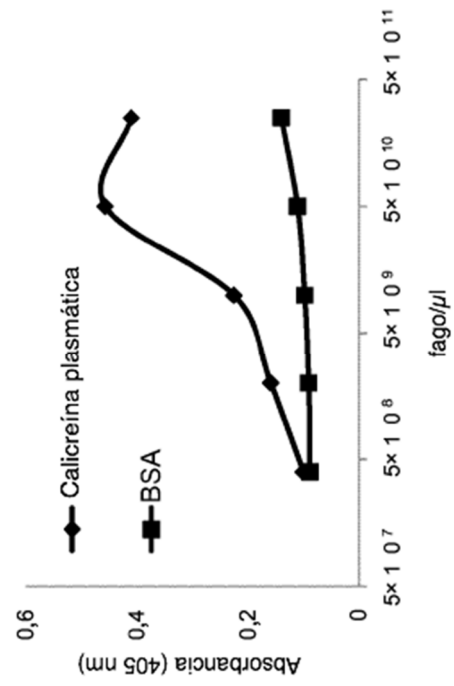
REIVINDICACIONES

1. Una biblioteca de péptidos que comprende una pluralidad de péptidos diferentes en la que los péptidos comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14 en el Listado de Secuencias en la que la secuencia de nucleótidos ha sido modificada reemplazando un secuencia de nucleótidos que consiste en la 43ª base timina a la 93ª base timina con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias, en la que la biblioteca de péptidos tiene una diversidad de al menos 1×10^5 .
2. La biblioteca de péptidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la biblioteca tiene una diversidad de al menos 1×10^8 , preferiblemente al menos 1×10^{10} .
3. La biblioteca de péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que cada uno del 1º Xaa al 5º Xaa, el 7º Xaa, el 9º Xaa y el 10º Xaa contando desde el terminal amino de la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias en cada péptido de dicha pluralidad de péptidos es independientemente cualquier aminoácido distinto de cisteína y prolina.
4. La biblioteca de péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que cada uno del 6º Xaa y 8º Xaa contando desde el extremo amino de la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias en cada péptido de dicha pluralidad de péptidos es independientemente cualquier aminoácido distinto de cisteína.
5. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la biblioteca es una biblioteca de presentación de fagos, una biblioteca de presentación de ribosomas o una biblioteca de presentación de ácidos nucleicos.
6. Un procedimiento de identificación de un péptido que se une a una molécula diana, que comprende los siguientes pasos (i) y (ii):
 - (i) poner en contacto péptidos contenidos en la biblioteca de péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con la molécula diana; y
 - (ii) recuperar un péptido que se une a la molécula diana.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la molécula diana se deriva de un ser humano.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la molécula diana no es una diana endógena de SPINK2.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la diana endógena es tripsina y/o acrosina.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la molécula diana es una serina proteasa distinta de tripsina y/o acrosina, en el que el péptido inhibe la actividad proteolítica de la serina proteasa, y en el que el procedimiento comprende la etapa adicional (iii):
 - (iii) determinar que el péptido es positivo para la inhibición, cuando el péptido inhibe la actividad proteolítica de la serina proteasa.

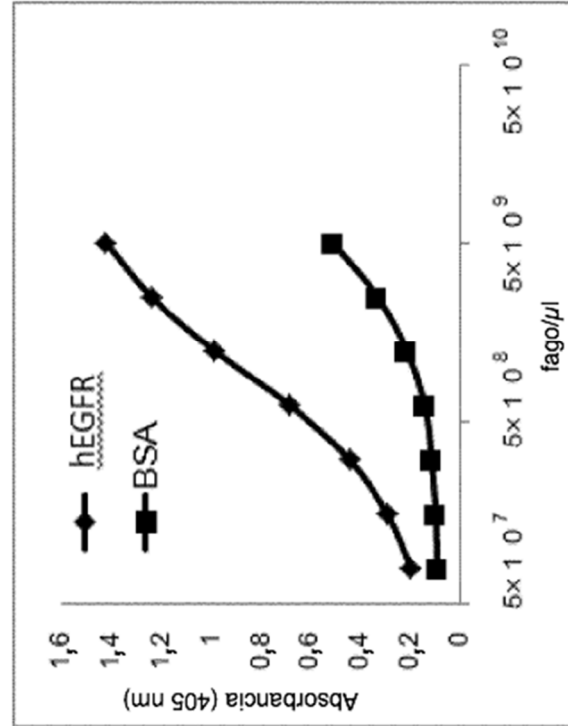
[Figura 1]



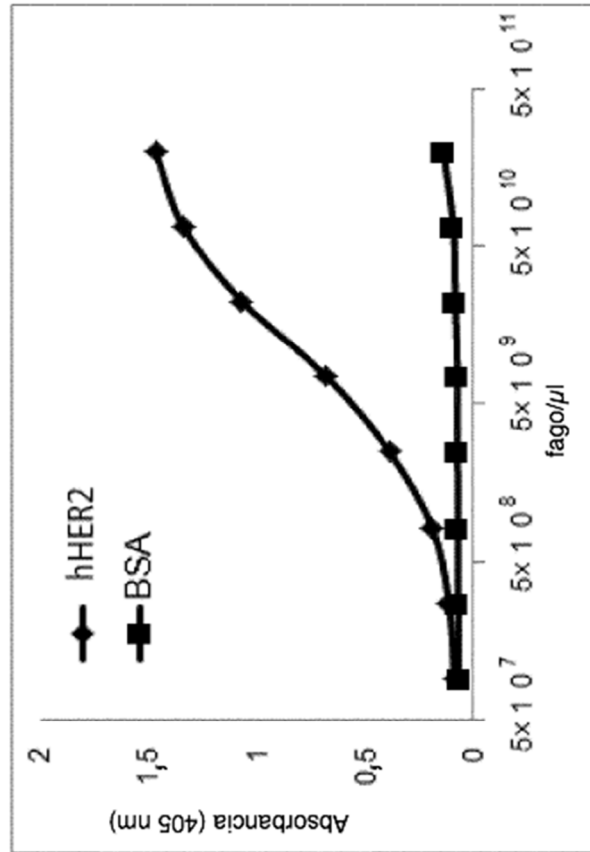
[Figura 2]



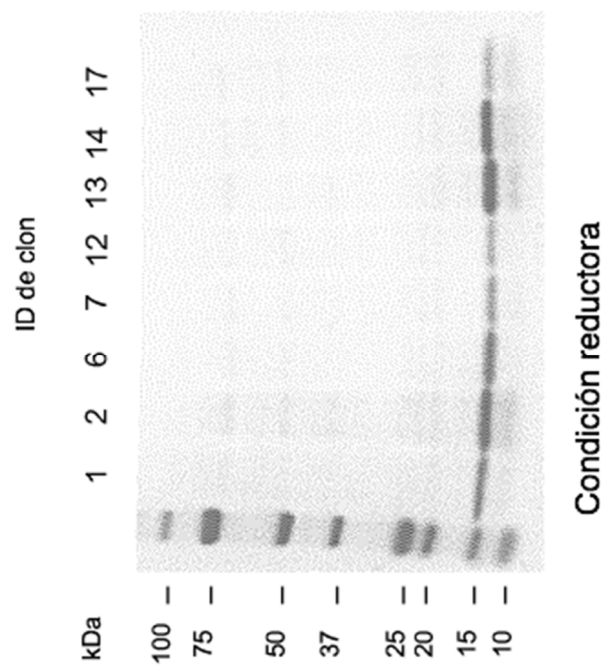
[Figura 3]



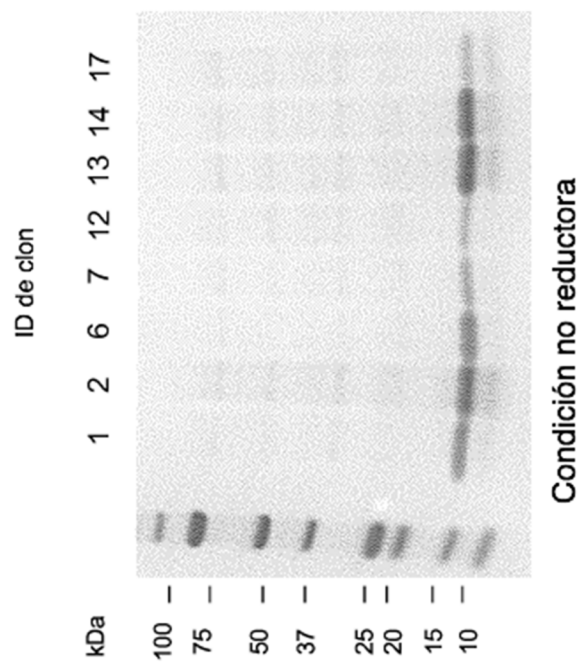
[Figura 4]



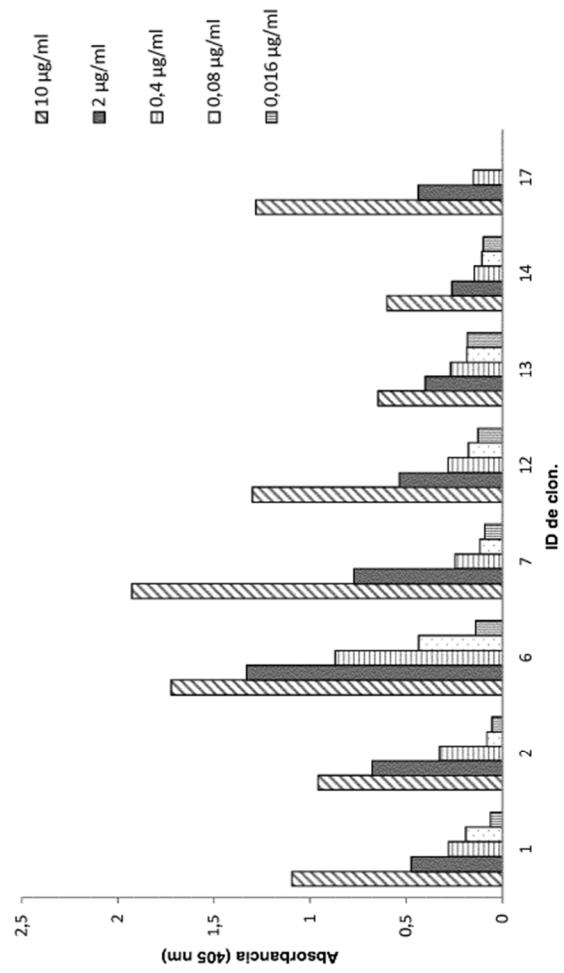
[Figura 5]

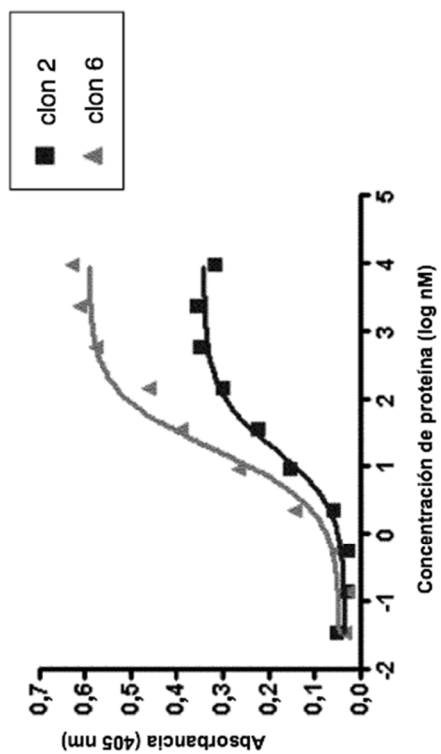


[Figura 6]

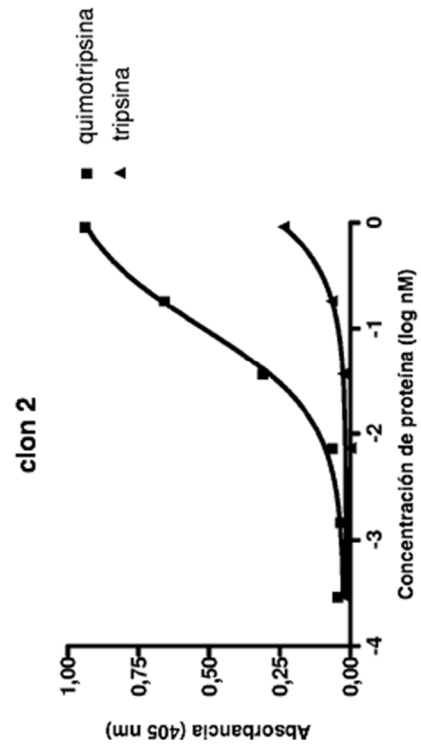


[Figura 7]



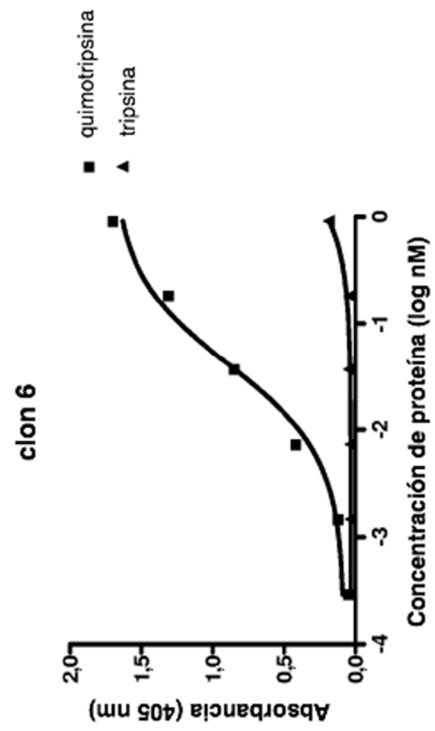


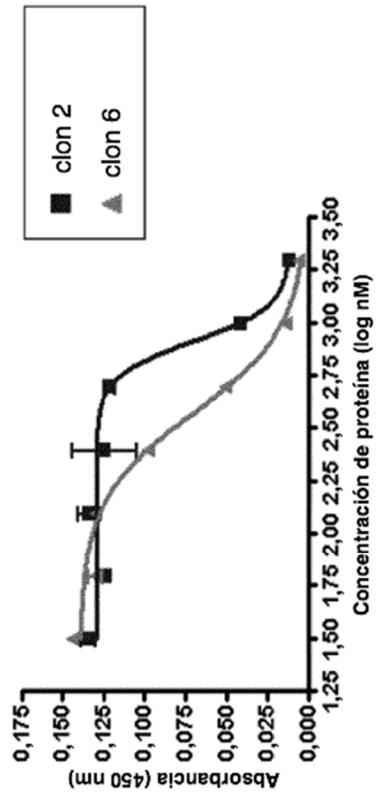
[Figura 8]



[Figura 9]

[Figura 10]





[Figura 11]

[Figura 12]

Mutante SPINK2 (Péptido de unión a α -quimotripsina)	Secuencia de aminoácido
Péptido No.1 (SEQ ID No.2)	CRTRW GNRCT WQYKP VC
Péptido No.2 (SEQ ID No.3)	CMRHR RHFC T MVYKP VC
Péptido No.6 (SEQ ID No.4)	CRRWL LPWCT YKYKP VC
Peptide No.7 (SEQ ID No.5)	CLWRR HKLCP FFKP VC
Péptido No.12 (SEQ ID No.6)	CWR SW RWACP YMYKP VC
Péptido No.13 (SEQ ID No.7)	CWF FR WRWCN WALKP VC
Péptido No.14 (SEQ ID No.8)	CSTWR MWGCP WLYKP VC
Péptido No.17 (SEQ ID No.9)	CWRRW YDRCS FNLKP VC

[Figura 13]

CXXXX XXXCX XXXXP VC

(X representa cualquier aminoácido)

[Figura 14]

GTACCCGATAAAAGCGGCTTCCTGACAGGAGGCCGTTTTGTTTTGCAGCCCACCT

[Figura 15-1]

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGG
 TTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTT
 TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAA
 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCC
 TTATTCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGG
 TGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCTCGAGTGGGTACATCGAACTGG
 ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA
 TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
 AAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAC
 CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTG
 CCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC
 CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATC
 GTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC
 CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAG
 CTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC
 TGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
 GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCG
 TAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG
 CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCAT
 ATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATT

[Figura 15-2]

TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG
 TGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
 AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACC
 AGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGG
 CTTACAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA
 CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
 AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA
 GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCATACAGCCCAG
 CTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG
 CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG
 AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCC
 TGTCGGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
 GCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTG
 CTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCG
 TATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAG
 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
 GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG
 CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTT
ACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA
CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGA
 TTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCTTTCTATGCGG
 CCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAACTGCAGGTGACCTCGAGATCAAACGGGCGG
 CCGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAGACTG
 TTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATAAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAG
 ACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAG
 GCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTCCTAT

[Figura 15-3]

TGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGG
 TGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCC
 GGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAA
 CCCCCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGTT
 TCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAGTGTATACGGGCACTGT
 TACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAA
 AGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCCATTCTGG
 CTTTAATGAGGATCCATTGTTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCA
 ACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGGCTCTGAGGG
 TGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGG
 TGGCGGCTCCGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGG
 GGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACT
 TGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTC
 CGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATCCCAAAT
 GGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTT
 ACCTTCTTTGCCTCAGTCGGTTGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAAACC
 ATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTT
 TCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCG
 TAATAAGGAGTCTTAATAAGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGG
 AAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTGCCAGCT
 GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGA
 ATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTAC
 ACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC
 GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGC
 TCCTTTGCGTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGC
 TCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGAC

[Figura 15-4]

CCCAAAAACTTGATTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACG
GTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAA
ACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTG
CCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACGCGAAT
TTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCAGTCTCAGTACAATCTGCTCT
GATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGA
CGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGC
TGCAITGTGTCAGAGGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCGC

[Figura 16]

AATTTCTAGATAACGAGGGCAAATCATGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTT
ACCGTTGCTGTTTACCCCTGTGACGAAAGCTGCTAGCGCGAATTCTGATCCGCAGTT
TGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTAGCCAGTATCGTCTGCCTGGTTG
TCCGCGTCATTTTAATCCGGTTTGTGGTAGCGATATGAGCACCTATGCAAATGAATG
TACCCTGTGCATGAAAATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGG
TCCGTGCGACGCGTCTGCGGCCGC

[Figura 17]

CTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTGTCTGCCGTTTAATC

[Figura 18]

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTAGCCAGTATCGT
CTGCCTGGTTGTCCGCGTCATTTTAATCCGGTTTGTGGTAGCGATATGAGCACCTAT
GCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAATAATT
ATTCGCAATGGTCCGTGCTAA

[Figura 19]

DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNPCGSDMSTYANECTLCMKIREGGHNIKI
IRNGPC

[Figura 20-1]

GAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGC
 AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGGTACCCGATAAAA
 GCGGCTTCCTGACAGGAGGCCGTTTTGTGTTTGCAGCCCACCTCAACGCAATTAATGT
 GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTAT
 GTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGA
 TTACGAATTTCTAGATAACGAGGGCAAATCATGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCA
 CTCTTACCGTTGCTGTTTACCCCTGTGACGAAAGCTGCTAGCGCGAATTCTGATCCG
 CAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTAGCCAGTATCGTCTGCCT
 GGTGTCCGCGTCATTTTAATCCGGTTTGTGGTAGCGATATGAGCACCTATGCAAAT
 GAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGC
 AATGGTCCGTGCGACGCGTCTGCGGCCGCATAGGCAGGTGCATCTGGCGGTGGTTCT
 GCGCAACCGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAAC
 GTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGG
 AATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAACTCAGTGTTACGGTACATGG
 GTTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGT
 TCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACA
 CCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACT
 GAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACT
 TTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAATGTTTATACG
 GGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTA
 TCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTC
 CATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGAC
 CTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGG

[Figura 20-2]

CGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGG
 CGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTTCCGG
 TGATTTTGATTATGAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGC
 CGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTGATTCTGTCGCTACTGA
 TTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAA
 TGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGG
 TGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCTTTGCCTCAGTC
 GGTGGAATGTCGCCCTTATGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGA
 TTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCAC
 CTTTATGTATGTATTTTCGACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATA
 GTACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTGTCTGCCGTTT
 AATGAATTC