

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 329**

51 Int. Cl.:

**C40B 40/10** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2015 PCT/CN2015/083260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17004745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2015 E 15897401 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3294934**

54 Título: **Método de construcción de biblioteca de péptidos y vectores relacionados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.08.2020**

73 Titular/es:

**HUNAN ZONSEN PEPLIB BIOTECH CO., LTD.**  
**(100.0%)**

**5th Building, Modern Service Industry  
Headquarters No. 1769, Yunlong Avenue Yunlong  
Demonstration Zone Zhuzhou  
Hunan, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, ZHUYING y  
LI, XIANGQUN**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 777 329 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

Método de construcción de biblioteca de péptidos y vectores relacionados.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método de construcción de bibliotecas completas de péptidos, tal como una biblioteca completa de tripéptidos, de pentapéptidos, de hexapéptidos, o de octapéptidos, etc. El método incluye construir un vector de expresión para la expresión de los péptidos etiquetados. Cada péptido etiquetado contiene una serie de péptidos de tamaños diferentes y el número de péptidos en una biblioteca completa de péptidos puede reducirse drásticamente respecto a la síntesis química convencional de péptidos. Además, las bibliotecas pueden reproducirse fácilmente. El método mejorado de preparación de bibliotecas de péptidos puede utilizarse particularmente para, por ejemplo, construir una biblioteca completa de pentapéptidos.

15 **Antecedentes de la invención**

Las bibliotecas de péptidos, que contienen un gran número de péptidos que presentan una combinación sistemática de aminoácidos, se aplican ampliamente como una potente herramienta para el cribado de grandes números de péptidos en la búsqueda de péptidos bioactivos críticos en la investigación biológica, en estudios relacionados con proteínas y en el desarrollo de fármacos. Es conocido que los péptidos de bajo peso molecular resultan menos alergénicos y las diversas funciones fisiológicas de los péptidos los convierten en candidatos adecuados para el desarrollo de agentes terapéuticos (Host A, Halken S. Hypoallergenic formulas - when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication!, *Allergy* 59(supl. 78):45-52, agosto, 2004; Lax R. The future of peptide development in the pharmaceutical industry. *Phar Manufacturing: Int. Pept. Rev.* 2010; Agyei D, Danquah MK. Industrial scale manufacturing of pharmaceutical grade bioactive peptides, *Biotechnol. Adv.* 29(3):272-7, mayo-junio 2011). Por lo tanto, los péptidos bioactivos son candidatos adecuados para una nueva era de productos farmacéuticos, especialmente con la mayor preocupación por los efectos secundarios de los fármacos de molécula pequeña y la creciente atención a alimentos y nutracéuticos más frescos y 'más verdes' que posean propiedades de prevención o fomento de la salud (Danquah MK, Agyei D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA, Biotechnology* 29;1(2):5, dic., 2012).

Se han descubierto muchos tipos de péptido bioactivo, incluyendo péptidos antimicrobianos, anticáncer, antioxidantes, antihipertensores, antitrombóticos, opioides, antivíricos, citomoduladores e inmunomoduladores, etc. (Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive peptide: A Review. *Int. J. BioAUTOMATION* 15(4):223-250, 2011; Danquah MK, Agyei D., *Pharmaceutical applications of bioactive peptides. OA, Biotechnology* 29;1(2):5, dic., 2012). Por lo tanto, el desarrollo de fármacos peptídicos es uno de los campos más prometedores en el desarrollo de nuevos fármacos.

Debido a que la biblioteca de péptidos proporciona una potente herramienta para el desarrollo de fármacos, interacciones proteína-proteína y otras aplicaciones bioquímicas, así como farmacéuticas, se han desarrollado varios métodos de construcción de bibliotecas de péptidos. Dichos métodos de construcción de bibliotecas de péptidos se clasifican en dos categorías: la utilización de herramientas de química sintética y los enfoques biotecnológicos. En 1985 George P. Smith presentó la tecnología de expresión fágica, que permite el cribado de una enorme cantidad de péptidos diferentes (Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science* 228, 1315-1317, 1985). Se encontró que el éxito de los péptidos derivados de fagos dependía esencialmente de la calidad de la biblioteca cribada (Lindner T, Kolmar H, Haberkorn U y Mier W. *DNA Libraries for the Construction of Phage Libraries: Statistical and Structural Requirements and Synthetic Methods. Molecules* 16, 1625-1641, 2011); sin embargo, no existe ningún método práctico para monitorizar o garantizar la calidad de la biblioteca de expresión fágica. En efecto, hasta ahora únicamente unos pocos de los péptidos seleccionados mediante expresión fágica han entrado en aplicación (Lindner T, Kolmar H, Haberkorn U y Mier W. *DNA Libraries for the Construction of Phage Libraries:clínica Statistical and Structural Requirements and Synthetic Methods. Molecules* 16, 1625-1641, 2011).

Basándose en la síntesis en fase sólida desarrollada por Merrifield, se ha desarrollado el método combinatorial de 'síntesis de separación-mezcla' para la construcción de bibliotecas de péptidos (Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. Int. J. Peptide Protein Res.*, 37, 487-493, 1991). En teoría, puede sintetizarse un gran número de péptidos de esta manera a fin de producir una biblioteca grande; sin embargo, en la práctica, el número y cantidad de péptidos sintetizados de esta manera es limitado debido al elevado coste y bajo rendimiento de producción de la síntesis de bibliotecas.

Una biblioteca de péptidos asimismo puede construirse mediante la síntesis de un gran número de péptidos diferentes. Debido a que no existe ninguna buena forma de predecir qué péptido será un buen candidato a fármaco, se desea construir una biblioteca completa de péptidos que contenga todas las posibles combinaciones de aminoácidos a fin de que la probabilidad de encontrar buenos candidatos a fármaco durante el cribado de péptidos sea elevada. Existen 20 aminoácidos naturales; se requiere sintetizar 8.000 tripéptidos para construir una biblioteca completa de tripéptidos. De manera similar, necesitan sintetizarse 160.000 tetrapéptidos para construir una

biblioteca completa de tetrapéptidos; necesitan sintetizarse 3,200,000 pentapéptidos para construir una biblioteca completa de pentapéptidos y necesitan sintetizarse 64,000,000 hexapéptidos para construir una biblioteca completa de hexapéptidos. Nuevamente, debido al elevado coste y bajo rendimiento de producción para sintetizar un gran número de péptidos, actualmente no se encuentra disponible en el mercado ni siquiera una biblioteca completa de tetrapéptidos, que debería contener 160,000 tetrapéptidos; y todavía menos una biblioteca completa de pentapéptidos o hexapéptidos.

De esta manera, todavía existe una necesidad de un procedimiento altamente productivo para construir bibliotecas de péptidos con grandes capacidades. Las formas de realización de la presente invención se refieren a dicho procedimiento de construcción de bibliotecas de péptidos con grandes capacidades.

### Breve resumen de la invención

Es un objetivo de la presente exposición proporcionar nuevos métodos de construcción de bibliotecas completas de péptidos que expresan y exponen un gran número de diversos tamaños de péptidos, polipéptidos o proteínas. Se diseña un péptido de hasta 200 aminoácidos de manera que: (i) el péptido no forme ninguna estructura terciaria significativa según predicen las herramientas disponibles de predicción de estructura de proteínas, (ii) el péptido contenga el menor número posible de repeticiones peptídicas cortas, incrementando de esta manera la capacidad de la biblioteca de péptidos. El péptido se expresa en forma de una cola C-terminal de una proteína de etiqueta, tal como GST, SUMO, CBD, etc. La etiqueta se expresa en primer lugar y después se pliega correctamente; la cola peptídica se expresa después en forma de una cola de movimiento libre. El péptido se expresa en el extremo C-terminal de la proteína de etiqueta, denominado "expresión de proteína"; la etiqueta facilita la expresión y purificación del péptido. La biblioteca de péptidos construida de esta manera se denomina biblioteca de péptidos "de expresión de proteínas".

Es otro objetivo de la presente invención según se reivindica proporcionar un método para expresar un gran número de péptidos a partir de un único péptido expresado; un método para incrementar la capacidad de la biblioteca significativamente. Según se define en la reivindicación 1, con un diseño razonable, un péptido expresado de 50 aminoácidos de hecho puede contener 47 tetrapéptidos consecutivos diferentes, 46 pentapéptidos consecutivos diferentes, 45 hexapéptidos consecutivos diferentes, 44 heptapéptidos consecutivos diferentes, etc. 3 péptidos 48-meros consecutivos diferentes, 2 péptidos 49-meros consecutivos diferentes y 1 péptido 50-mero, lo que constituye 408 péptidos con tamaños comprendidos entre 4 y 50 aminoácidos.

Es todavía otro objetivo de la presente invención según se reivindica proporcionar un método de construcción de una biblioteca completa de péptidos con un número de péptidos significativamente reducido. Según se define en la reivindicación 1, con un diseño razonable, un péptido expresado de 50 aminoácidos de hecho puede contener 47 tetrapéptidos consecutivos diferentes, 3,405 péptidos 50-meros expresados pueden constituir una biblioteca completa de tetrapéptidos; sin embargo, se requieren 160,000 tetrapéptidos sintéticos para construir una biblioteca completa de tetrapéptidos. 3,405 péptidos 50-meros sintéticos asimismo pueden constituir una biblioteca completa de tetrapéptidos, aunque el coste será excesivamente elevado debido al bajo rendimiento de producción para sintetizar tantos péptidos largos (50-meros). Sin embargo, no hay problema en expresar un péptido etiquetado sea el péptido largo (50-mero) o corto.

Es todavía otro objetivo de la exposición proporcionar un método de construcción de una biblioteca completa de pentapéptidos. Con un diseño razonable, un péptido expresado de 50 aminoácidos puede contener de hecho 46 pentapéptidos consecutivos diferentes, sólo se requieren 69,566 péptidos 50-meros expresados en lugar de 3,200,000 pentapéptidos sintéticos para construir una biblioteca completa de pentapéptidos mediante dicho método de expresión de proteínas.

Es todavía otro objetivo de la presente invención según se reivindica proporcionar un método para construir una biblioteca incompleta de péptidos con un número de péptidos significativamente reducido. Para péptidos más largos, tales como octapéptidos, decapeptidos o péptidos incluso más grandes, tales como péptidos 15-meros o 20-meros, las bibliotecas completas contendrán números enormes de todos los posibles péptidos, que son  $2.56 \times 10^{10}$ ,  $1.024 \times 10^{13}$ ,  $3.277 \times 10^{19}$ ,  $1.049 \times 10^{26}$ , respectivamente. Por lo tanto, no resulta práctico sintetizar químicamente tantos péptidos para producir una biblioteca completa de péptidos. Sin embargo, no resultará necesario en todos los casos construir una biblioteca completa, ya que algunos péptidos compartirán una elevada similitud de las secuencias. Mediante el diseño racional, puede reducirse en gran medida el número de péptidos para construir una biblioteca de péptidos eficiente. El presente método de la invención reducirá adicionalmente el número de péptidos en una biblioteca de péptidos, de manera que la construcción de una biblioteca de péptidos eficiente resulte práctica.

Es un objetivo adicional de la presente exposición proporcionar un método alternativo de construcción de una biblioteca completa de péptidos. La secuencia de ADN de cada péptido se clonará en un vector de expresión para la expresión y purificación del péptido etiquetado. El vector puede almacenarse y el péptido puede expresarse o reproducirse a partir del vector fácilmente en cualquier momento. Al contrario que la síntesis de péptidos, cada péptido necesita resintetizarse desde cero. Otra ventaja de dicho método es que los péptidos etiquetados de

diferentes tamaños pueden expresarse y purificarse con una facilidad similar; sin embargo, los péptidos más largos necesitarán un esfuerzo mucho mayor que péptidos cortos similares durante la síntesis química.

5 Es un objetivo de la presente exposición proporcionar un método para construir vectores de expresión para la expresión y purificación de péptidos etiquetados para la construcción de una biblioteca de péptidos.

10 Los detalles de las formas de realización de la exposición se explican en los dibujos adjuntos y en la descripción, a continuación. Otras características, objetivos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

### 10 **Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos**

15 El breve resumen anterior, así como la descripción detallada de la invención, a continuación, se entenderán mejor en referencia a los dibujos adjuntos. Para el propósito de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos formas de realización que actualmente resultan preferidas. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se encuentra limitada por los dibujos presentados.

En los dibujos:

20 la figura 1 ilustra esquemáticamente la tecnología de expresión de proteína según una forma de realización de la invención.

25 La figura 2 ilustra esquemáticamente la elevada capacidad de los péptidos etiquetados expresados en un hospedador de expresión según una forma de realización de la invención.

La figura 3 ilustra esquemáticamente un vector de expresión para expresar los péptidos etiquetados.

La figura 4 ilustra esquemáticamente la matriz de péptidos etiquetados.

30 La figura 5 ilustra esquemáticamente la expresión y purificación de la matriz de péptidos etiquetados.

La figura 6 ilustra esquemáticamente la detección y análisis de la matriz de péptidos etiquetados.

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

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el significado entendido comúnmente por el experto en la materia a la que se refiere la presente invención.

40 Las formas de realización de la presente invención se refieren a métodos y vectores útiles para construir una biblioteca de péptidos. En un aspecto, la invención se refiere a una mejora significativa de la construcción de una biblioteca de péptidos mediante la síntesis química convencional. Por ejemplo, la presente invención según se reivindica proporciona un método mejorado de construcción de una biblioteca de péptidos en el que los péptidos se expresan y se purifican fácilmente y el número de péptidos para formar una biblioteca se reduce significativamente.

50 Según formas de realización de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de los péptidos se diseñan racionalmente de manera que cada péptido etiquetado puede contener una matriz de péptidos diferentes de tamaños diferentes, incrementando de esta manera la capacidad de la biblioteca. Dependiendo del tamaño del péptido etiquetado, cada péptido puede contener 20, 30, 50 o incluso 100 péptidos diferentes de un tamaño específico. Por lo tanto, los métodos según formas de realización de la presente invención reducen en gran medida el número de péptidos en una biblioteca de péptidos; de esta manera, la construcción y cribado de la biblioteca de péptidos se lleva a cabo a un coste significativamente reducido.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "péptido", "biblioteca", "etiqueta", "proteína", "vector", "capacidad", "completo" y "matriz" deben entenderse en su contexto más amplio.

60 En un aspecto general, la presente invención según se reivindica se refiere a un método de construcción de bibliotecas completas de péptidos con un número reducido de péptidos en comparación con el método convencional de síntesis de péptidos. Por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 1, un péptido relativamente largo se expresa y purifica fácilmente en el extremo C-terminal de una etiqueta de proteína, o el péptido se expresa en el extremo de una proteína, es decir, una "expresión de proteína". En comparación con la expresión de proteínas, la síntesis química de péptidos relativamente largos no es eficiente ni eficaz en relación a los costes. Por ejemplo, un péptido 50-mero requerirá varios días para la síntesis química, mientras que un péptido similar puede expresarse fácilmente en un hospedador bacteriano durante la noche. El rendimiento global de péptido 50-mero sintetizado químicamente será bajo, mientras que puede expresarse fácilmente un péptido similar en un

- 5 hospedador de expresión a cualquier escala. En contraste, una forma de realización de la presente invención según se reivindica proporciona un método en el que puede construirse una biblioteca completa de péptidos con un número de péptidos significativamente reducido; estos péptidos pueden expresarse y purificarse fácilmente, y estos péptidos pueden reproducirse fácilmente en cualquier momento. El método según la forma de realización de la presente invención ha recortado en gran medida el tiempo y el coste requeridos para la construcción de la biblioteca de péptidos.
- 10 Las formas de realización de la invención se refieren a etiquetas proteicas que resultan útiles en la expresión de péptidos. Una de las etiquetas proteicas es GST (glutación S-transferasa), que se utiliza comúnmente para purificar una proteína diana fusionada con GST. GST puede ayudar a la expresión de la proteína o péptido diana.
- 15 En una forma de realización de la invención, la etiqueta proteica comprende una de las etiquetas seleccionadas de, aunque sin limitación, por ejemplo, GST, Trx, SUMO, CBD, FLAG, HA, AviTag, His tag, Myc-Tag, SBP, Strep-tag, Fc-Tag, Halo-Tag, V5, VSV, MBP, etc.
- En una forma de realización, la etiqueta proteica comprende una combinación de etiquetas seleccionadas de, aunque sin limitación, por ejemplo, GST, Trx, SUMO, CBD, FLAG, HA, AviTag, His Tag, Myc-Tag, SBP, Strep-Tag, Fc-Tag, Halo-Tag, V5, VSV, MBP, etc.
- 20 En todavía otra forma de realización de la invención, pueden añadirse etiquetas adicionales en el extremo C-terminal del péptido o incluso en la parte intermedia del péptido a fin de facilitar la expresión y purificación del péptido. Las etiquetas proteicas pueden seleccionarse de, aunque sin limitación, GST, Trx, SUMO, CBD, FLAG, HA, AviTag, His tag, Myc-Tag, SBP, Strep-tag, Fc-Tag, Halo-Tag, V5, VSV, MBP, etc.
- 25 Puede añadirse un conector peptídico corto, de unos cuantos aminoácidos o más, entre la etiqueta y el péptido a fin de incrementar la accesibilidad del péptido.
- Puede añadirse además una secuencia de reconocimiento de proteasa entre la etiqueta y el péptido de manera que el péptido pueda escindirse de la etiqueta utilizando una proteasa, en caso necesario.
- 30 Resultará evidente para el experto en la materia que la presente invención incluye modificaciones de las formas de realización anteriormente indicadas a fin de mejorar adicionalmente la construcción de bibliotecas. Entre dichas modificaciones se incluyen, aunque sin limitación, la adición de una o múltiples secuencias peptídicas a la forma de realización anterior. Por ejemplo, pueden añadirse unos cuantos aminoácidos Cys al péptido para formar enlaces disulfuros para tensionar la estructura del péptido.
- 35 Puede utilizarse una diversidad de métodos para diseñar las secuencias peptídicas para preparar una biblioteca de péptidos eficiente en vista de la presente exposición. Por ejemplo, para facilitar la expresión soluble del péptido etiquetado, deben evitarse las secuencias peptídicas que contengan tramos largos de aminoácidos hidrofóbicos.
- 40 Resultará evidente para el experto en la materia que el péptido puede diseñarse de manera que no forme estructuras terciarias significativas según predicen las herramientas disponibles de predicción de estructuras de proteínas.
- 45 Asimismo resultará evidente para el experto en la materia que el péptido puede diseñarse de manera que el péptido pueda contener tantos péptidos cortos diferentes como resulte posible, incrementando de esta manera la capacidad de la biblioteca de péptidos.
- Según las formas de realización ilustradas en la figura 2, un péptido expresado de 50 aminoácidos de hecho puede contener 47 tetrapéptidos consecutivos diferentes, 46 pentapéptidos consecutivos diferentes, 45 hexapéptidos consecutivos diferentes, 44 heptapéptidos consecutivos diferentes, etc. 3 péptidos 48-meros consecutivos diferentes, 2 péptidos 49-meros consecutivos diferentes y 1 péptido 50-mero, lo que constituye 408 péptidos con tamaños comprendidos entre 4 y 50 aminoácidos.
- 50 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que el péptido etiquetado incluso puede contener hasta 200 o más aminoácidos, aunque el tamaño óptimo será de entre 30 y 100. Los péptidos más largos presentarán una mayor probabilidad de formación de estructuras terciarias en las que algunas secuencias peptídicas no se encontrarán expuestas para el cribado.
- 55 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que, en lugar de sintetizar 160,000 tetrapéptidos químicamente, 3,405 péptidos 50-meros expresados pueden constituir una biblioteca completa de tetrapéptidos.
- 60 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que, en lugar de sintetizar 3,200,000 pentapéptidos químicamente, 69,665 péptidos 50-meros expresados pueden constituir una biblioteca completa de pentapéptidos.
- 65

5 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que algunos péptidos en una biblioteca de péptidos compartirán una similitud de secuencia elevada y que el número de péptidos para construir una biblioteca de péptidos eficiente puede reducirse en gran medida mediante el diseño racional. Por lo tanto, un número inferior a 3,405 péptidos 50-meros expresados puede constituir una biblioteca eficiente de tetrapéptidos. De manera similar, un número inferior a 69,665 péptidos 50-meros expresados puede constituir una biblioteca eficiente de tetrapéptidos.

10 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que el péptido etiquetado puede contener más de 50 aminoácidos, reduciendo adicionalmente de esta manera el número de péptidos etiquetados expresados. Por lo tanto, un número incluso inferior de péptidos expresados puede constituir una biblioteca eficiente de tetrapéptidos o pentapéptidos.

15 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que algunos péptidos en una biblioteca de péptidos compartirán una similitud de secuencias y una similitud de estructuras elevadas, y el número de péptidos para construir una biblioteca eficiente de péptidos puede reducirse adicionalmente mediante el diseño racional. Por lo tanto, un número práctico de péptidos etiquetados expresados puede constituir una biblioteca eficiente de polipéptidos, tal como una biblioteca de octapéptidos, una biblioteca de decapeptidos, o incluso bibliotecas de péptidos más largos, tales como una biblioteca de péptidos 15-meros, una biblioteca de péptidos 20-meros o incluso una biblioteca de péptidos 30-meros.

20 En una forma de realización preferida, 69,665 péptidos 50-meros etiquetados con GST expresados pueden diseñarse, clonarse en un vector de expresión, expresarse y purificarse para constituir una biblioteca completa de pentapéptidos.

25 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que asimismo pueden utilizarse otra u otras etiquetas en lugar de GST; las etiquetas pueden seleccionarse de, aunque sin limitación, Trx, SUMO, CBD, FLAG, HA, AviTag, His tag, Myc-Tag, SBP, Strep-tag, Fc-Tag, Halo-Tag, V5, VSV, MBP, etc.

30 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que el péptido etiquetado puede contener más de 50 aminoácidos o menos de 50 aminoácidos, reduciendo o incrementando adicionalmente de esta manera el número de péptidos etiquetados expresados para constituir una biblioteca completa de péptidos.

35 Según las formas de realización ilustradas en la figura 3, puede construirse un vector de expresión de péptidos etiquetados para contener opcionalmente una o más secuencias de ADN de etiqueta de afinidad, una secuencia de ADN conector, opcionalmente un sitio de reconocimiento de proteasa, un sitio de clonación múltiple para insertar una secuencia de ADN de expresión de péptido.

40 En las formas de realización anteriormente indicadas, el experto en la materia conocerá que el vector de expresión puede construirse basándose en, aunque sin limitación, un vector de expresión bacteriano, un vector de expresión de levadura, un vector de expresión de insecto, un vector de expresión fúngico, un vector de expresión de mamífero y un vector de expresión vegetal.

45 En otra forma de realización de la presente invención, los péptidos etiquetados pueden expresarse en una forma purificada a partir de un hospedador de expresión. El hospedador de expresión se selecciona de entre el grupo que consiste en, aunque sin limitación, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula de mamífero y una célula vegetal.

50 El experto en la materia apreciará fácilmente que asimismo pueden aplicarse generalmente métodos similares a la construcción de una biblioteca de péptidos. Los péptidos diseñados se expresan, se purifican utilizando una etiqueta de afinidad inmovilizada sobre una superficie sólida, y después se utilizan para el cribado con los péptidos todavía unidos a la superficie sólida. Los péptidos diseñados asimismo pueden eluirse de la superficie sólida y después utilizarse para el cribado.

55 Los ejemplos específicos siguientes son adicionalmente ilustrativos de la naturaleza de la invención; debe entenderse que la invención no se encuentra limitada a los mismos.

**Ejemplo**

60 Expresión de proteínas

La secuencia de ADN de una matriz de tres péptidos (Myc-V5-Flag, GAACAGAACTGATTAGCGAGGAAGACCTT-GGTAACCGATTCCGAACCC GTTGCTGGCCTGGACAGCACG-GACTATAAAGATGACGATGACAAA) se clonó en el vector pGS21 después de la secuencia génica de GST utilizando el método de clonación estándar, asimismo se añadió una secuencia conectora TCGGATCTGGCCACACAGGCCATAGATCTGGTACCGACGACGACGACAA GGCCATGGGT entre

GST y la matriz peptídica. El péptido etiquetado con GST se expresó en una cepa de *E. coli* utilizando IPTG como inductor.

5 El péptido etiquetado con GST se purificó utilizando una columna de Ni-IDA. El péptido etiquetado con GST se unió a la columna de Ni-NDA y se eluyó de la columna con imidazol 300 mM. La elución se dializó frente a una solución de diálisis (Tris 0.01 M-HCl, pH 7.6, en agua).

10 La figura 5 muestra que la matriz de péptidos etiquetados con GST se expresa como una proteína soluble, en la que el carril M es un marcador proteico con el peso molecular indicado a la izquierda; el carril 1 son las proteínas completas sin inducción (no ind.); el carril 2 son las proteínas completas con inducción con IPTG 1 mM (Ind.); el carril 3 es el eluido (EL) de la muestra y el carril 4 es el péptido etiquetado con GST purificado (tPept.).

15 La figura 6 ilustra los resultados del ELISA. El ensayo se llevó a cabo utilizando el método ELISA estándar con anticuerpo secundario marcado con HRP. Cada uno de los tres péptidos (Myc-V5-Flag con la secuencia de aminoácidos EQKLISEEDL-GKPIPPLLGLDST-DYKDDDDK) puede reconocerse y detectarse mediante el anticuerpo correspondiente. CN es un control negativo. 1X significa que la muestra purificada no había sido diluida y se había utilizado directamente para el ensayo de ELISA, mientras que 5X y 25X significan que la muestra purificada se había diluido 5 veces y 25 veces, respectivamente. Se utilizó solución de TMB como el sustrato para HRP.

20 **Listado de secuencias**

<110> HOHAI UNIVERSITY  
 <120> MÉTODO DE CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECA DE PÉPTIDOS Y VECTORES RELACIONADOS  
 25 <130> SG15P047HT  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 96  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Myc-V5-Flag  
 <400> 1  
 35 gaacagaaac tgattagcga ggaagacctt ggtaaaccga ttccgaaccc gttgctgggc 60  
 ctggacagca cggactataa agatgacgat gacaaa 96  
 <210> 2  
 <211> 60  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia enlazadora  
 <400> 2  
 45 tcggatctgg gccacacagg ccatagatct ggtaccgacg acgacgacaa ggccatgggt 60

## REIVINDICACIONES

1. Método integrado de construcción de una biblioteca de péptidos completa que contiene todos los péptidos posibles para el tamaño específico, comprendiendo el método:
- 5
- (i) diseñar racionalmente una serie de péptidos etiquetados de manera que cada péptido etiquetado contiene una matriz de péptidos distintos de tamaños diferentes, conteniendo cada péptido una matriz de secuencias peptídicas cortas en el que el péptido comprende 50 aminoácidos que contienen 47 tetrapéptidos consecutivos distintos, 46 pentapéptidos consecutivos distintos, 45 hexapéptidos consecutivos distintos, 44 heptapéptidos consecutivos distintos, 3 péptidos 48-meros consecutivos distintos, 2 péptidos 49-meros consecutivos distintos y 1 péptido 50-mero, que constituye 408 péptidos con tamaños comprendidos entre 4 y 50 aminoácidos;
- 10
- (ii) construir una serie de vectores de expresión con cada vector expresando un péptido etiquetado único;
- 15
- (iii) purificar los péptidos etiquetados uniendo la etiqueta de afinidad a una superficie sólida inmovilizada;
- (iv) eluir los péptidos etiquetados y utilizar la biblioteca para el cribado.
- 20
2. Método según la reivindicación 1 caracterizado por que el método implica diseñar 69,665 péptidos 50-meros etiquetados expresados, que son clonados posteriormente en un vector de expresión, expresados y purificados para constituir una biblioteca de pentapéptidos completa; preferentemente etiquetados con GST, Trx, SUMO, CBD, FLAG, HA, AviTag, His tag, Myc-Tag, SBP, Strep-tag, Fc-Tag, Halo-Tag, V5, VSV, MBP; todavía más preferentemente péptidos 50-meros etiquetados con GST.
- 25
3. Método según la reivindicación 1 o 2, que comprende la etapa (v) que utiliza los péptidos inmovilizados directamente para el cribado sin elución a partir de la fase sólida.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se encuentran presentes 3,200,000 secuencias de pentapéptido diferentes en la biblioteca.
- 30
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se encuentran presentes 64,000,000 secuencias de hexapéptido diferentes en la biblioteca.
- 35
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se encuentran presentes 1,280,000,000 secuencias de heptapéptido diferentes en la biblioteca.
- 40
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se encuentran presentes 25,600,000,000 secuencias de octapéptido diferentes en la biblioteca.
- 45
8. Método según las reivindicaciones 1 y 7, en el que la biblioteca de péptidos es una biblioteca de tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, péptido incompleta que contiene algunas de la totalidad de secuencias de tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, péptido posibles en la biblioteca conteniendo cada péptido único una matriz de secuencias de tetra-, penta-, hepta-, octa-, y demás, péptido diferentes.
- 50
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la biblioteca de péptidos es una biblioteca de péptidos que contiene una serie de péptidos de tamaños diferentes comprendidos entre 20 aminoácidos y 200 aminoácidos.
- 55
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etiqueta se selecciona de entre el grupo que consiste en GST, Trx, SUMO, CBD, FLAG, HA, AviTag, His tag, Myc-Tag, SBP, Strep-tag, Fc-Tag, Halo-Tag, V5, VSV y MBP.
- 60
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el hospedador de expresión se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula de mamífero y una célula vegetal.
- 65
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector de expresión se selecciona de entre el grupo que consiste en un vector de expresión bacteriano, un vector de expresión de levadura, un vector de expresión de insecto, un vector de expresión fúngico, un vector de expresión de mamífero y un vector de expresión vegetal.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se añade una secuencia de péptido entre la etiqueta y el péptido como un conector para aumentar la accesibilidad del péptido.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que opcionalmente se añade una secuencia

de reconocimiento de proteasa entre la etiqueta y el péptido de manera que el péptido pueda escindirse de la etiqueta utilizando una proteasa.



FIG. 1

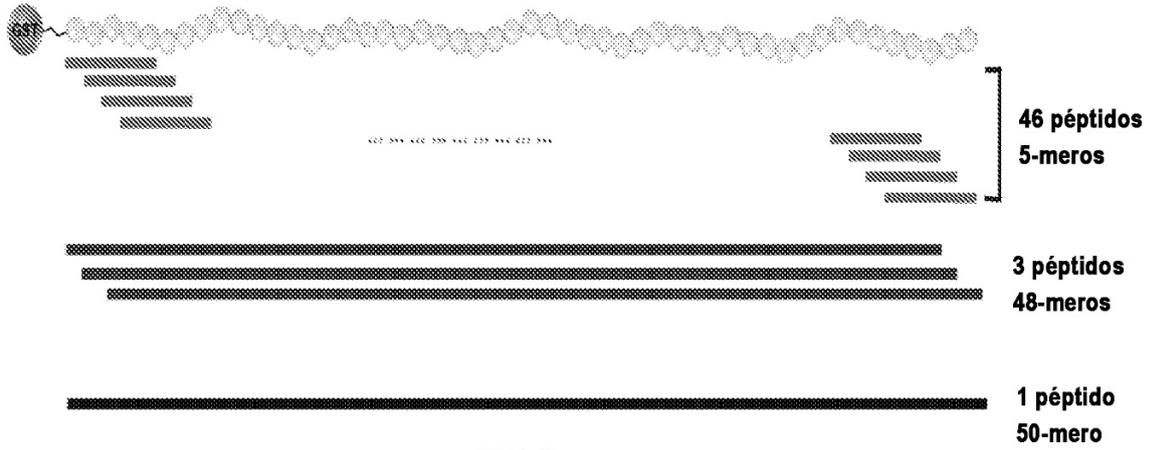


FIG. 2

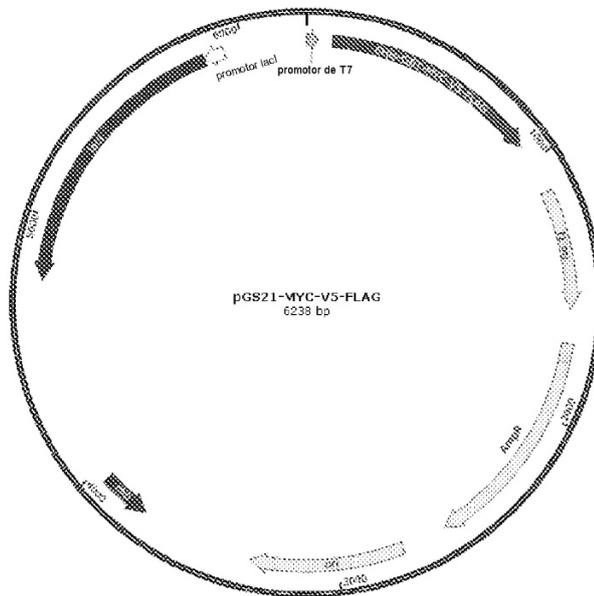


FIG. 3

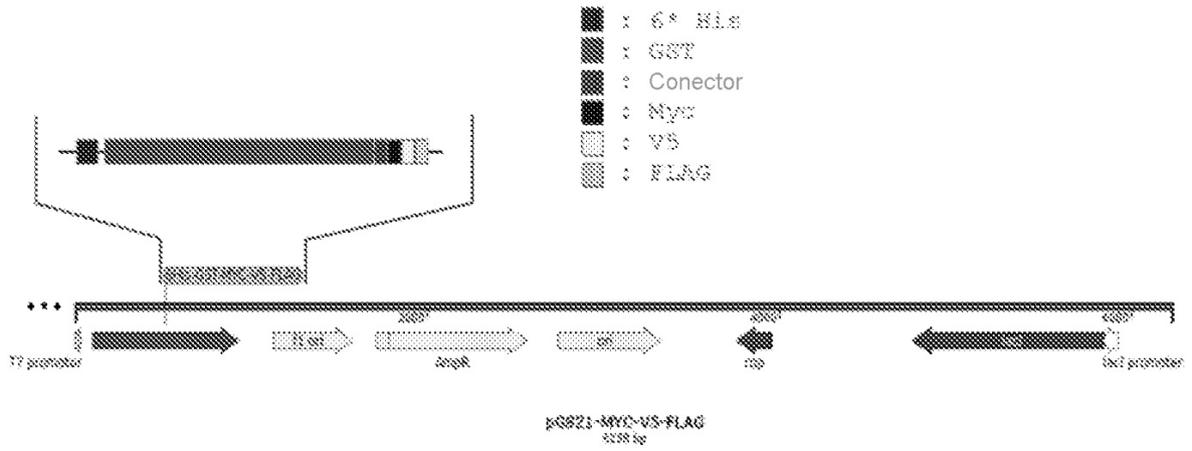


FIG. 4

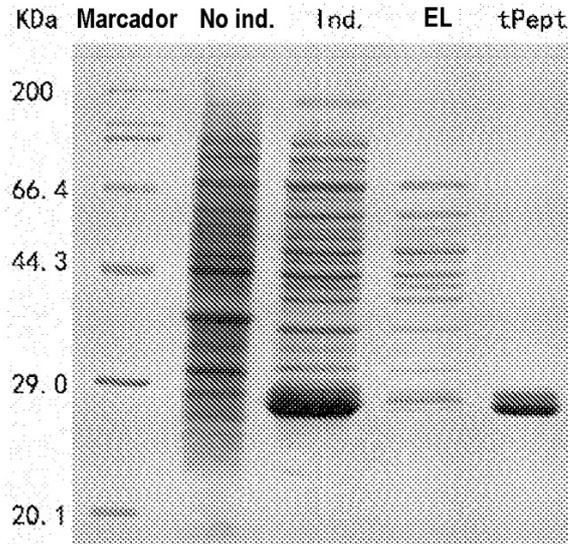


FIG. 5

RESULTADO DE ELISA

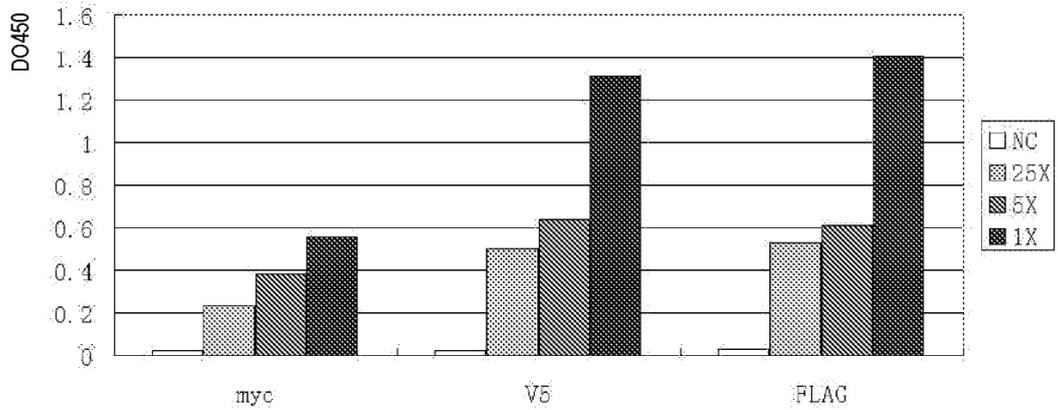


FIG. 6