



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 362**

51 Int. Cl.:
C07K 14/31 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03713152 .1**
96 Fecha de presentación : **20.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1485407**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54 Título: **Una proteína mutada de unión a inmunoglobulina.**

30 Prioridad: **25.03.2002 SE 2002100943**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.09.2009

73 Titular/es: **GE Healthcare Bio-Sciences AB.**
751 84 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Hober, Sophia**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 325 362 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

Una proteína mutada de unión a inmunoglobulina.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de proteínas mutantes, y más específicamente a una proteína mutante que exhibe estabilidad mejorada en comparación con la molécula pariente así como a un método de producción de una proteína mutante según la invención. La invención también se refiere a una matriz de separación por afinidad, donde una proteína según la invención es usada como un ligando de afinidad.

Antecedentes

Un gran número de aplicaciones en la industria biotecnológica y farmacéutica necesitan atención para comprender la separación definitiva de contaminantes. Dichos contaminantes pueden, por ejemplo, ser moléculas no eluidas adsorbidas en la fase estacionaria o matriz en un procedimiento cromatográfico, tal como moléculas o microorganismos no deseados, que incluyen por ejemplo, proteínas, carbohidratos, lípidos, bacterias y virus. La separación de tales contaminantes a partir de la matriz normalmente es llevada a cabo tras una primera elusión del producto deseado con el fin de regenerar la matriz antes de su uso posterior. Tal separación normalmente implica un procedimiento conocido como limpieza en el sitio (LES), donde se usan agentes capaces de eluir contaminantes de la fase estacionaria. En el presente, el agente de limpieza y sanitario más extensamente usado es NaOH, y la concentración del mismo puede estar en el intervalo de 0,1 hasta por ejemplo 1 M, dependiendo del grado y la naturaleza de la contaminación. NaOH es conocido por ser un agente LES eficaz que logra la reducción multirregistro de contaminantes, tales como microbios, proteínas, lípidos y ácido nucleicos. Otra ventaja del NaOH es que se elimina fácilmente sin ningún otro tratamiento. Sin embargo, esta estrategia está asociada a la exposición de la matriz a pH por encima de 13. Para muchas matrices de cromatografía por afinidad que contienen ligandos de afinidad proteicos, tales como medio ambiente alcalino, es una condición muy severa y, posteriormente, da como resultado capacidades disminuidas a causa de la inestabilidad del ligando implicado en el alto pH.

Así, se ha enfocado una investigación más extensa sobre el desarrollo de ligandos proteicos manipulados que exhiben una capacidad mejorada para resistir valores de pH alcalino. Por ejemplo, Gülich *et al* (Susane Gülich, Martín Linhult, Per-Anke Nygren, Mathias Uhlén, Sophia Hober, Journal of Biotechnology 80 (2000), 169-17: Stability towards alkaline conditions can be engineered into a protein ligand) sugirieron la manipulación de proteínas para mejorar las propiedades de estabilidad de un dominio de unión a albúmina (DUA) de Staphylococcus en medios ambientes alcalinos. Anteriormente, se mostró que la modificación estructural, tal como desaminación y escisión de la estructura peptídica, de restos de asparagina y glutamina en condiciones alcalinas es la razón principal para la pérdida de actividad en el tratamiento en soluciones alcalinas, y que la asparagina es el más sensible de los dos (Geiger, T., y S. Clarke. 1987. Deamination, Isomerization, and Racemization of Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. J. Biol. Chem. 262:785-794). También se conoce que el ritmo de desaminación es altamente específico y dependiente de la conformación (Kosky, A.A., U.O. Razzaq, M.J. Treuheit, y D.N. Brems. 1999. The effect of alpha-helix on the stability of Asn residues: deamination rates in peptides of varying helicity. Protein Sci. 8:2519-2523; Kosiakoff, A.A. 1988. Tertiary structure is a principal determinant to protein deamidation. Science. 240:191-194; y Lura, R., y V. Schirch. 1988. Role of peptide conformation in the rate and mechanism of deamidation of asparaginyl residues. Biochemistry. 27:7671-7677), y los semi-tiempos de desaminación más cortos han sido asociados con las secuencias -asparagina-glicina- y -asparagina-serina. Por consiguiente, Gülich *et al.* crearon un mutante de DUA, donde los cuatro restos de asparagina del DUA natural han sido sustituidos por leucina (un resto), asparato (dos restos) y lisina (un resto). Además, Gülich *et al.* describen que su mutante exhibe un comportamiento de unión a proteína diana similar al de la proteína natural, y que las columnas de afinidad que contienen el ligando manipulado muestran capacidades de unión superiores tras exposición repetida a condiciones alcalinas que las columnas preparadas usando el ligando pariente no manipulado. Así, se concluyó en la presente memoria que los cuatro restos de asparagina pueden ser sustituidos sin ningún efecto significativo sobre la estructura y la función.

Así, los estudios llevados a cabo por Gülich *et al* se llevaron a cabo sobre el dominio de unión a albúmina de Streptococcus. Sin embargo, la cromatografía por afinidad también se usa para la purificación de otras moléculas, tales como inmunoglobulinas, por ejemplo para aplicaciones farmacéuticas. Una clase particularmente interesante de reactivos de afinidad son las proteínas capaces de unirse de forma específica a partes invariables de una molécula de anticuerpo, tal interacción siendo independiente de la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Tales reactivos pueden ser ampliamente usados para la recuperación por cromatografía por afinidad de inmunoglobulinas de diferentes muestras tales como, pero no limitadas a, preparaciones de suero o plasma o cultivos celulares derivados de conjuntos de alimentación. Un ejemplo de tal proteína es la proteína A de Staphylococcus, que contiene dominios capaces de unirse a las porciones Fc y Fab de inmunoglobulinas IgG de diferentes especies.

Los reactivos basados en la proteína A de Staphylococcus (SpA), debido a su alta afinidad y selectividad, han encontrado un amplio uso en el campo de la biotecnología, por ejemplo, en cromatografía por afinidad para capturar y purificar anticuerpos así como para su detección. En el presente, un medio de afinidad basado en SpA probablemente es el medio de afinidad más ampliamente usado para aislar anticuerpos monoclonales y sus fragmentos a partir de diferentes muestras, incluyendo conjuntos de alimentación de cultivos celulares. Por consiguiente, están disponibles comercialmente varias matrices que comprenden ligandos de proteína A, por ejemplo, en forma de proteína A nativa

ES 2 325 362 T3

(por ejemplo Proteína A Sepharose™, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y también comprendidas por proteína A recombinante (por ejemplo, rProteína A Sepharose™, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Más específicamente, la manipulación genética llevada a cabo en dicha proteína A recombinante comercial es realizada para facilitar la unión de la misma al soporte.

5

Por consiguiente, existe la necesidad en este campo de obtener ligandos de proteínas capaces de unir inmunoglobulinas, especialmente vía los fragmentos Fc de las mismas, que también son tolerantes a uno o más procedimientos de limpieza usando agentes alcalinos.

10 Compendio de la presente invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un ligando proteico mutado de unión a inmunoglobulina que exhibe una estabilidad mejorada a valores de pH aumentados, y por consiguiente, una tolerancia mejorada a la limpieza bajo condiciones alcalinas, en comparación a la molécula pariente.

15

Otro objeto de la invención es proporcionar tal ligando proteico, que se une específicamente al fragmento Fc de inmunoglobulinas, tales como IgG, IgA y/o IgM.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un ligando proteico como se describe más arriba, que también exhibe una afinidad que se conserva durante un periodo de tiempo más largo en condiciones alcalinas que aquella molécula pariente.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una matriz de separación por afinidad, que comprende ligandos proteicos mutantes capaces de unir inmunoglobulinas, tales como IgG, IgA y/o IgM, preferiblemente vía sus fragmentos Fc, cuyos ligandos exhiben una tolerancia mejorada a la limpieza bajo condiciones alcalinas, en comparación con el ligando de la molécula pariente.

Uno o más de los objetos arriba definidos pueden lograrse como se describe en las reivindicaciones posteriores.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra alineamientos de aminoácidos de los cinco dominios homólogos (E, D, A, B y C) de SpA.

La Figura 2 (a) y (b) ilustra los resultados obtenidos tras tratamiento alcalino (limpieza en el lugar) de proteínas mutantes según la invención en comparación con la proteína Z desestabilizada.

La Figura 3 muestra el gen que codifica la Z(N23T/N3A/N6D)-Cys tras inserción dentro de un vector como se describe en el ejemplo 4(a).

La Figura 4 muestra un mapa plasmídico del plásmido pAY91, como se describe en el ejemplo 4(a).

La Figura 5 muestra el gen que codifica la Z(N23T/N3A/N6D) tras la inserción dentro de un vector como se describe en el ejemplo 4(b).

La Figura 6 muestra un ejemplo de mapa plasmídico para el plásmido pAY100 como se describe en el ejemplo 5.

La figura 7 muestra el adaptador para introducir un sitio *KpnI* dentro de un vector con promotor SPA y secuencia señal según el ejemplo 6.

50

La Figura 8 muestra el plásmido pAY104, que contiene el promotor SPA y la secuencia señal a ser usados para la introducción de un adaptador que contiene un sitio *KpnI*, tal como se describe en el ejemplo 6.

La Figura 9 muestra el plásmido resultante, pAY128, tras la inserción del adaptador según el ejemplo 6.

55

La Figura 10 muestra el casete de clonación construido del ejemplo 6, donde el adaptador original está subrayado.

La Figura 11 muestra el plásmido pAY114 tras la inserción de Z(N23T/N3A/N6D)-Cys- tetrámero como se describe en el ejemplo 6.

60

La Figura 12 muestra el casete de clonación construido del ejemplo 7, donde el adaptador original está subrayado.

La Figura 13 muestra el plásmido resultante, pAY129, tras la inserción del adaptador según el ejemplo 7.

La Figura 14 muestra el plásmido pAY125 tras la inserción de Z(N23T/N3A/N6D)-Cys- tetrámero como se describe en el ejemplo 7.

65

ES 2 325 362 T3

La Figura 15 es una cromatografía obtenida de una separación de IgG humana (hIgG), como se describe en el ejemplo 8.

La Figura 16 muestra gráficos que representan la capacidad de unión dinámica restante de las matrices según el ejemplo 8.

Definiciones

El término “proteína” se usa en la presente memoria para describir proteínas, así como fragmentos de las mismas. Así, cualquier cadena de aminoácidos que exhibe una estructura tridimensional está incluida en el término “proteína”, y se abarcan fragmentos de proteína.

El término “variante funcional” de una proteína significa en la presente memoria una proteína variante, donde la función, en relación a la invención definida como afinidad y estabilidad, están esencialmente conservadas. Así, uno o más aminoácidos que no son relevantes para dicha función pueden haber sido cambiados.

El término “molécula pariente” se usa en la presente memoria para la proteína correspondiente en la forma antes de que se haya introducido una mutación según la invención.

El término “estabilidad estructural” se refiere a la integridad de la forma tridimensional de una molécula, mientras que “estabilidad química” se refiere a la capacidad para resistir a la degradación química.

El término “proteína de unión al fragmento Fc” significa que la proteína es capaz de unirse al fragmento Fc de una inmunoglobulina. Sin embargo, no se excluye que una proteína de unión al fragmento Fc también pueda unir otras regiones, tales como regiones Fab de inmunoglobulinas.

En la presente memoria, si no se refiere a sus nombres completos, los aminoácidos son denominados con los símbolos convencionales de una letra.

Las mutaciones se definen en la presente memoria por el número de la posición cambiada, precedido del aminoácido salvaje o no mutado y seguido del aminoácido mutado. Así, por ejemplo, la mutación de una asparagina en posición 23 con una treonina se denomina N23T.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de unión a inmunoglobulina capaz de unirse a otras regiones de la molécula de inmunoglobulina distintas de las regiones de determinación de la complementariedad (CDR), dicha proteína comprende dos o más unidades que se repiten de la proteína 2 en la cual la posición 23 está definida como SEQ ID NO:1 o treonina. Así, al menos un resto de asparagina de una proteína de unión a inmunoglobulina pariente ha sido mutada a un aminoácido distinto de glutamina, tal mutación confiere una estabilidad química aumentada en valores de pH alcalinos en comparación con la molécula pariente. La estabilidad aumentada significa que la afinidad inicial de la proteína mutada para la inmunoglobulina está esencialmente conservada durante un periodo de tiempo más largo, como se discutirá más abajo.

La afinidad conservada de la proteína diana lograda según la invención, se debe en parte a una conformación espacial conservada de la proteína mutante. La afinidad de proteínas mutadas a inmunoglobulinas puede, por ejemplo, ser ensayada por el experto en la materia usando tecnología de biosensores usando, por ejemplo, un sistema Biacore™ 2000 clásico (Biacore AB, Uppsala, Suecia), como se ilustrará en la parte experimental de más abajo. En este contexto, se entiende del término “esencialmente” conservado que la proteína mutada exhibe una afinidad por inmunoglobulina que es del mismo orden de magnitud que la de la molécula pariente. Por consiguiente, en una fase inicial, la capacidad de unión de la proteína mutada es comparable con la de la proteína pariente. Sin embargo, debido a la estabilidad química de la proteína mutada discutida más abajo, que está conservada en el tiempo, su capacidad de unión disminuirá más lentamente que la de la molécula pariente en un medio ambiente alcalino. El medio ambiente puede definirse como alcalino, que significa un valor aumentado de pH, por ejemplo, por encima de aproximadamente 10, tal como hasta aproximadamente 13 o 14, es decir, de 10-13 o 10-14, en general denominado condiciones alcalinas. Alternativamente, las condiciones pueden estar definidas por la concentración de NaOH, que puede ser de hasta aproximadamente 1,0 M, tal como 0,7 M o específicamente aproximadamente 0,5 M, por consiguiente dentro de un intervalo de 7-1,0 M.

La estabilidad química aumentada de la proteína mutada según la invención puede ser confirmada fácilmente por el experto en la materia en este campo, por ejemplo, por tratamiento de rutina con NaOH a una concentración de 0,5 M, tal como se describirá en la parte experimental de más abajo. En este contexto, se entiende que similar a lo que se dice más arriba, una estabilidad “aumentada” significa que la estabilidad inicial está conservada durante un periodo de tiempo más largo que la que se logra por la molécula pariente. Aunque se han descrito mutaciones similares para un dominio de unión de albúmina de *Streptococcus* (Gülich *et al.*, véase más arriba), se conoce bien que el ritmo de desaminación implicado en la susceptibilidad proteica a la degradación en medio ambiente alcalino es altamente dependiente de la secuencia y de la conformación. Mientras que la secuencia de aminoácidos de DUA no comprende similitud de secuencia aminoacídica con las proteínas de unión a inmunoglobulina tales como

ES 2 325 362 T3

los dominios individuales de la proteína A de *Staphylococcus*, no parece, por las enseñanzas de Gülich *et al.*, que se puedan aplicar también a las proteínas de unión a inmunoglobulina. Sin embargo, la presente invención muestra por primera vez que la mutación de uno o más restos de asparagina de una proteína de unión a inmunoglobulina proporciona de forma sorprendente una estabilidad química aumentada y por ello, un ritmo de degradación disminuido en medios ambientes donde el pH está por encima de aproximadamente 10, tal como hasta aproximadamente 13 o 14.

Por ello, la presente invención proporciona una proteína mutada, que es útil por ejemplo como proteína ligando en cromatografía por afinidad para la adsorción selectiva de inmunoglobulinas, tales como IgG, IgA y/o IgM, preferiblemente IgG, de especies de mamíferos, tales como un ser humano. El propósito de la adsorción puede ser tanto producir un producto purificado, tal como una fracción de inmunoglobulina pura o un líquido a partir del cual la inmunoglobulina ha sido separada, como detectar la presencia de inmunoglobulina en una muestra. El ligando según la invención exhibe una estabilidad química suficiente para resistir la limpieza alcalina convencional durante un periodo de tiempo prolongado, que hace del ligando un candidato atractivo para la operación eficaz a gran escala, donde la regeneración de la columna es una necesidad.

Por consiguiente, en la proteína según la invención, uno o más restos de asparagina (N) han sido mutados a aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), serina (S), treonina (T), cisteína (C), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), ácido glutámico (E), arginina (R), histidina (H), lisina (K) o prolina (P), o cualquier aminoácido modificado que no es susceptible a desaminación o isomerización no deseada. Alternativamente, uno o más restos de asparagina (N) han sido mutados a glutamina (Q).

La proteína de unión a inmunoglobulina puede ser cualquier proteína con una capacidad de unión a inmunoglobulina natural, tal como proteína A de *Staphylococcus* (SpA), o proteína G de *Streptococcus* (SpG). Para una revisión de otras proteínas, véase por ejemplo, Krovall, G., Jonson, K. Receptins: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian proteins, *J. Mol. Recognit.* 1999 Jan-Feb; 12(1):38-44. Revisión.

En una realización, la presente invención es una proteína mutada, que comprende al menos la región de unión de una proteína de unión a inmunoglobulina y donde al menos está presente una mutación de asparagina dentro de dicha región. Por consiguiente, en esta realización, una proteína mutada según la invención comprende al menos aproximadamente 75%, tal como al menos aproximadamente 80% o preferiblemente al menos aproximadamente 95%, de la secuencia tal como se defina en SEQ ID NO: 1 o 2, siempre que la mutación de asparagina no esté en posición 21.

En la presente memoria, la SEQ ID NO: 1 define una secuencia aminoacídica del dominio B de SpA y la SEQ ID NO: 2 define una proteína conocida como proteína Z.

La proteína Z es una construcción sintética derivada del dominio B de SpA, donde la glicina en posición 29 ha sido intercambiada por alanina, y esto se ha descrito en la literatura, véase por ejemplo Sthal *et al.*, 1999. Affinity fusions in biotechnology; focus on protein A and protein B, en la Enciclopedia de Tecnología de Bioprocesos: Fermentación, Biocatálisis y Bioseparación. M.C. Fleckinger y S.W. Drew, editores. John Wiley e Hijos Inc., Nueva York, 8-22. Además, la proteína Z ha sido usada como ligando en cromatografía de afinidad. Sin embargo, aunque la proteína Z exhibe una estabilidad química mejorada a ciertos compuestos químicos distintos de NaOH en comparación con el dominio B de SpA, todavía no es tan estable en condiciones de valores de pH aumentados, necesarios para soportar las muchas etapas CIP de regeneración deseadas en una planta industrial económica.

En una realización, la proteína mutante arriba descrita está comprendida por una secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1 o 2, o es una variante funcional de la misma. El término "variante funcional" como se usa en este contexto incluye cualquier secuencia similar, que comprende una o más variaciones adicionales en posiciones de aminoácidos que no tienen influencia en la afinidad de la proteína mutante con las inmunoglobulinas o en su estabilidad química mejorada en medios ambientes de valores de pH aumentados.

En una realización ventajosa, la(s) presente(s) mutacione(s) están seleccionadas del grupo que consiste en N23T; N23T y N43E; N28A; N6A; N11S; N11S y N23T; y N6A y N23T; y donde la molécula pariente comprende la secuencia definida por SEQ ID NO: 2. Tal como se menciona más arriba, con el fin de conseguir una proteína mutante útil como ligando con alta capacidad de afinidad durante un periodo de tiempo prolongado en condiciones alcalinas, se evita la mutación del resto de asparagina en posición 21. En una realización, el resto de asparagina en posición 3 no está mutado.

En la realización más ventajosa, en la presente proteína, se ha mutado un resto de asparagina localizado entre un resto de leucina y un resto de glutamina, por ejemplo a un resto de treonina. Así, en una realización, el resto de asparagina en posición 23 de la secuencia definida en SEQ ID NO: 2 ha sido mutado, por ejemplo a un resto de treonina. En una realización específica, el resto de asparagina en posición 43 de la secuencia definida por SEQ ID NO: 2 también ha sido mutado, por ejemplo a un ácido glutámico. En la realización donde el aminoácido número 43 ha sido mutado, parece ser combinado de forma más ventajosa con al menos una mutación adicional, tal como N23T.

ES 2 325 362 T3

El descubrimiento según la invención de que varios restos de asparagina del dominio B de SpA y la proteína Z pueden ser atribuidos a distintas contribuciones a las propiedades de estabilidad y afinidad de la proteína mutada fue un poco inesperado, especialmente en vista de las enseñanzas arriba discutidas de Gülich *et al* donde se concluyó que todos los restos de asparagina de DUA pueden ser mutados sin ninguna discriminación interna.

Así, la invención abarca las proteínas mutantes monoméricas arriba discutidas. Sin embargo, dichos monómeros de proteínas pueden ser combinados a proteínas multiméricas, tales como dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros, etc. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención es un multímero comprendido por al menos una de las proteínas mutadas según la invención junto con una o más unidades adicionales, preferiblemente también proteínas mutantes según la invención. Así, la presente invención es, por ejemplo, un dímero comprendido por dos unidades que se repiten.

En una realización, el multímero según la invención comprende unidades monoméricas unidas por un despliegue de aminoácidos, preferiblemente en el intervalo de 0 a 15 aminoácidos, tales como 5-10. La naturaleza de tal unión preferiblemente no debería desestabilizar la conformación espacial de las unidades proteicas. Además, dicha unión preferiblemente también debería ser suficientemente estable en medios ambientes alcalinos para no afectar a las propiedades de las unidades proteicas mutadas.

En la mejor realización del presente, el multímero es un tetramero de proteína Z que comprende la mutación N23T, donde la longitud de las unidades de enlace es 5-10 aminoácidos. En una realización, el presente multímero comprende la secuencia VDAKFN-Z(N23T)-QAPKVDAKFN-Z(N23T)QAPKC. En otra realización, el multímero comprende la secuencia VDAKFD-Z(N23T)-QAPKVDAKFD-Z(N23T)ZQAPKC.

En una realización específica, el presente multímero también comprende uno o más de los dominios E, D, A, B y C de la proteína A de *Staphylococcus*. En esta realización, se prefiere que los restos de asparagina localizados en regiones de bucle hayan sido mutados a aminoácidos más estables a la hidrólisis. En una realización ventajosa por razones de estabilidad estructural, el resto de glicina en posición 29 de SEQ ID NO: 1 también ha sido mutado, preferiblemente a un resto de alanina. También, el ventajoso para la estabilidad estructural evitar la mutación del resto de asparagina en posición 52, ya que se ha encontrado que contribuye al contenido del a estructura secundaria en α hélice de la molécula de proteína A.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína mutante o multímero como se describe más arriba. Por consiguiente, la invención abarca una secuencia de ADN que puede ser usada en la producción de proteína mutante por expresión de la misma en un hospedador recombinante según los métodos biotecnológicos bien establecidos. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención es un sistema de expresión, que permite la producción de una proteína mutante como se describe más arriba. Convenientemente se pueden usar hospedadores bacterianos, por ejemplo, tal como se describen la parte experimental más abajo. En una realización alternativa, la presente invención es una línea celular que ha sido manipulada genéticamente para expresar una proteína mutante según la invención. Para métodos con este fin, véase por ejemplo Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

Naturalmente, una vez ha sido establecida la secuencia deseada, la proteína mutante según la invención alternativamente puede ser producida por métodos sintéticos.

Por consiguiente, la presente invención también incluye un método biotecnológico o sintético para producir una proteína o multímero mutante según la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una matriz para la separación por afinidad, tal matriz comprende ligandos que comprenden una proteína de unión a inmunoglobulinas acopladas a un soporte sólido, en cuya proteína, al menos un resto de asparagina ha sido mutado a un aminoácido distinto de glutamina. La presente matriz, cuando se compara con una matriz comprendida por la molécula pariente como ligando, exhibe una capacidad de unión aumentada durante dos o más separaciones con limpieza alcalina intermitente. El ligando de proteína mutado es preferiblemente una proteína de unión al fragmente Fc, y puede ser usada para unión selectiva de IgG, IgA y/o IgM, preferiblemente IgG.

La matriz según la invención puede comprender la proteína mutante como se describe más arriba en cualquier realización de la misma como ligando. En la realización más preferida, los ligandos presentes sobre el soporte sólido comprenden un multímero como se describe más arriba.

El soporte sólido de la matriz según la invención puede ser de cualquier tipo adecuado bien conocido. Una matriz de separación por afinidad convencional normalmente es de naturaleza orgánica y está basada en polímeros que exponen una superficie hidrofílica al medio acuoso usado, es decir, expone grupos hidroxilo (-OH), carboxi (-COOH), carboxamido (-CONH₂, posiblemente en forma N-sustituida), amino (-NH₂, posiblemente en forma sustituida), oligo- o polietileno en sus superficies externas y, si están presentes también en superficies internas. En una realización, los polímeros pueden, por ejemplo, estar basados en polisacáridos, tales como dextrano, almidón, celulosa, pululano, agarosa, etc, que ventajosamente han sido reticulados, por ejemplo con bisepóxidos, epihalohidrinatos, hidrocarburos inferiores 1,2,3-hihalo sustituidos, para proporcionar una adecuada porosidad y rigidez. En la realización más preferida, el soporte sólido es perlas de agarosa porosas. Los soportes usados en la presente invención pueden ser preparados

ES 2 325 362 T3

fácilmente según métodos clásicos, tales como gelificación en suspensión inversa (S Hjertén: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964). Alternativamente, las matrices base son productos comercialmente disponibles, tales como Sepharose™ FF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). En una realización, que es especialmente ventajosa para separaciones a gran escala, el soporte ha sido adaptado para aumentar su rigidez, y así hacer la matriz más adecuada para ritmos de flujo rápidos.

Alternativamente, el soporte sólido está basado en polímeros sintéticos, tales como alcohol de polivinilo, acrilatos de polihidroxialquilo, metacrilatos de polihidroxialquilo, poliacrilatos, polimetacrilamidas, etc. En el caso de polímeros hidrofóbicos, tales matrices basadas en bencenos divinil y monovinil sustituidos, la superficie de la matriz normalmente está hidrofílica para exponer grupos hidrofílicos como se define más arriba en un entorno de líquido acuoso. Tales polímeros son producidos fácilmente según métodos clásicos, véase por ejemplo "Styrene based polymer supports developed by suspensión polymerization" (R Arshady: Chimica e L'industria 70(9), 70-75 (1988)). Alternativamente, se usa un producto disponible comercialmente, tal como Source™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

En otra alternativa, el soporte sólido según la invención comprende un soporte de naturaleza inorgánica, por ejemplo, sílice, óxido de zirconio, etc.

Todavía en otra realización, el soporte sólido está en otra forma tal como una superficie, un chip, capilares, o un filtro.

Como consideración, la forma de la matriz según la invención, en una realización la matriz está en forma de monolito poroso. En una realización alternativa, la matriz está en forma de perla o partícula que puede ser porosa o no porosa. Las matrices en forma de perla o partícula pueden ser usadas como una perla llena o en forma suspendida. Las formas suspendidas incluyen aquellas conocidas como perlas expandidas y suspensiones puras, en las que las partículas o perlas están libres para moverse. En el caso de monolitos, perlas llenas o perlas expandidas, al procedimiento de separación comúnmente le sigue cromatografía convencional con un gradiente de concentración. En el caso de suspensiones puras, se usará el tratamiento a lo largo de lotes.

El ligando puede estar unido al soporte vía técnicas de acoplamiento convencionales usando, por ejemplo, grupos amino y/o carboxi presentes en el ligando. Bisepóxidos, epíclorohidrina, CNBr, N-hidroxisuccinimida (NHS), etc son reactivos de acoplamiento bien conocidos. Entre el soporte y el ligando, se puede introducir una molécula llamada espaciador, que mejorará la disponibilidad del ligando y facilitará el acoplamiento químico del ligando al soporte. Alternativamente, el ligando puede estar unido al soporte por enlaces no covalentes, tales como adsorción física o adsorción bioespecífica.

En una realización ventajosa, el presente ligando ha sido acoplado al soporte por enlaces tioéter. Métodos para llevar a cabo tal acoplamiento son bien conocidos en este campo y llevados a cabo fácilmente por el experto en la materia en este campo usando técnicas y equipos clásicos. En una realización ventajosa, el ligando está proporcionado primeramente con un resto de cisteína terminal para su uso posterior en el acoplamiento. El experto en la materia en este campo también lleva a cabo fácilmente etapas apropiadas de purificación.

Como se menciona más arriba, la afinidad a inmunoglobulina, es decir, propiedades de unión del presente ligando, y por ello, la capacidad de la matriz, no está esencialmente cambiada en el tiempo por el tratamiento con un agente alcalino. Convencionalmente, para un tratamiento de limpieza en el sitio de una matriz de separación por afinidad, el agente alcalino usado es NaOH y la concentración del mismo es hasta 0,75 M, tal como 0,5 M.

Por ello, otra manera de caracterizar la matriz según la invención es que debido a las mutaciones discutidas más arriba, su capacidad de unión disminuirá a menos de aproximadamente 70%, preferiblemente menos de aproximadamente 50% y más preferiblemente a menos de aproximadamente 30%, tal como aproximadamente 28%, tras el tratamiento con NaOH 0,5 M durante 7,5 horas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para aislar una inmunoglobulina, tal como IgG, IgA, y/o IgM, donde se usa una proteína mutante, un multímero o una matriz según la invención. Por ello, la invención abarca un proceso de cromatografía, donde al menos un compuesto diana es separado de un líquido por adsorción a una proteína mutante o un multímero o matriz descrita más arriba. El producto deseado puede ser el compuesto separado o el líquido. Por ello, este aspecto de la invención se refiere a cromatografía por afinidad, que es una técnica de separación ampliamente usada y bien conocida. En breve, en una primera etapa, una solución que comprende los compuestos diana, preferiblemente anticuerpos como se mencionan más arriba, se hace pasar por una matriz de separación en condiciones que permiten la adsorción del compuesto diana a los ligandos presentes sobre dicha matriz. Tales condiciones están controladas por ejemplo por pH y/o concentración de sal, es decir, fuerza iónica en la solución. Se debe tener cuidado para no exceder la capacidad de la matriz, es decir, el flujo debe ser suficientemente bajo para permitir una adsorción satisfactoria. En esta etapa, otros componentes de la solución pasarán a su través sin dificultad adicional. Opcionalmente, luego la matriz se lava, por ejemplo, con una solución acuosa, con el fin de separar las sustancias retenidas y/o holgadamente unidas. La presente matriz se usa de forma mucho más ventajosa con una etapa de lavado que utiliza un agente alcalino, tal como se discute más arriba. En una etapa siguiente, se hace pasar por la matriz una segunda solución denominada eluyente, bajo condiciones que proporcionan la desorción, es decir, la liberación del compuesto diana. Tales condiciones están comúnmente proporcionadas por un

cambio de pH, la concentración de la sal, es decir, fuerza iónica, hidrofobicidad, etc. Se conocen varios esquemas de elusión, tales como elución en gradiente y elusión de forma escalonada. La elusión también puede estar proporcionada por una segunda solución que comprende una sustancia competitiva, que sustituirá al anticuerpo deseado sobre la matriz. Para una revisión general de los principios de cromatografía por afinidad, véase, por ejemplo, Wichek, M., y Chaiken, I. 2000. An overview of affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.* 147:1-6.

En una realización alternativa, una proteína mutante según la invención es usada como compuesto líder en un proceso donde un compuesto orgánico es modelado para parecerse a su estructura tridimensional. El compuesto modelado se conoce como mimético. El diseño, síntesis y ensayo mimético puede ser usado para evitar un gran número de moléculas escrutadas al azar. En pocas palabras, tal método puede implicar determinar las partes particulares de la proteína que son críticas y/o importantes para una propiedad tal como unión a inmunoglobulinas. Una vez identificadas estas partes, su estructura es modelada según sus propiedades físicas, por ejemplo, estequiometría, enlaces, tamaño, carga, etc, usando datos de un intervalo de fuentes, tales como técnicas de espectroscopia, datos de difracción de rayos X y RMN. Se pueden usar en este proceso el análisis computacional, el cartografiado por similitud y otras técnicas. Las consideraciones importantes en este tipo de procesos son la facilidad para sintetizar un compuesto, la aceptación farmacológica, el patrón de degradación *in vivo*, etc.

Finalmente, la presente invención también comprende otros usos de la proteína mutante descrita más arriba, tales como en métodos analíticos, para propósitos médicos, por ejemplo, diagnóstico, en matrices, etc.

Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 muestra alineamientos de aminoácidos de los cinco dominios homólogos (E, D, A, B y C) de SpA. Las líneas horizontales indican la identidad de aminoácidos. Las tres cajas muestran las hélices α de Z_{wt} como se determinó por Tashiro y colaboradores (Tashiro *et al.*, 1997). Los restos de asparagina y también un resto de glicina en el dominio B, que se sustituyeron, están subrayados en la figura. También se muestran los alineamientos de aminoácidos para Z_{wt} y Z(N23T).

La Figura 2 ilustra los resultados obtenidos tras tratamiento alcalino (limpieza en el lugar) de las proteínas mutantes según la invención en comparación con la proteína Z desestabilizada. Una comparación de la capacidad tras tratamiento CIP repetido tras un esquema de cromatografía por afinidad ordinario. Se usó NaOH 0,5 M como agente limpiador. El protocolo se realizó 16 veces y la duración del saneamiento alcalino fue de 30 minutos por cada ronda. La Figura 2(a) muestra el patrón de inactivación para Z(F30A) y variantes de la misma, mientras que la Figura 2(b) muestra el patrón de inactivación para Z_{wt} y Z(N23T).

La Figura 3 muestra el gen que codifica Z(N23T/N3A/N6D)-Cys tras inserción dentro de un vector como se describe en el ejemplo 4(a). Las mutaciones están marcadas con *.

La Figura 4 muestra un mapa plasmídico del plásmido pAY91, que contiene el gen que codifica Z(N23T/N3A/N6D)-Cys como se describe en el ejemplo 4(a).

La Figura 5 muestra el gen que codifica Z(N23T/N3A/N6D) tras la inserción dentro de un vector como se describe en el ejemplo 4(b). Las mutaciones están marcadas con *.

La Figura 6 muestra un ejemplo de mapa plasmídico para el plásmido pAY100 que expresa el tetrámero de Z(N23T/N3A/N6D)-Cys como se describe en el ejemplo 5.

La Figura 7 muestra el adaptador para introducir un sitio *KpnI* dentro de un vector con promotor SpA y secuencia señal según el ejemplo 6.

La Figura 8 muestra el plásmido pAY104, que contiene el promotor SPA y la secuencia señal a ser usados para la introducción de un adaptador que contiene un sitio *KpnI*, como se describe en el ejemplo 6.

La Figura 9 muestra el plásmido resultante, pAY128, tras la inserción del adaptador según el ejemplo 6.

La Figura 10 muestra el casete de clonación construido del ejemplo 6, donde está subrayado el adaptador original.

La Figura 11 muestra el plásmido pAY114 tras la inserción de Z(N23T/N3A/N6D)-Cys-tetrámero como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 12 muestra el casete de clonación construido del ejemplo 7, donde está subrayado el adaptador original.

La Figura 13 muestra el plásmido resultante, pAY129, tras la inserción del adaptador según al ejemplo 7.

La Figura 14 muestra el plásmido pAY125 tras la inserción de Z(N23T/N3A/N6D)tetrámero-Cys como se describe en el ejemplo 7.

ES 2 325 362 T3

La Figura 15 es un cromatograma obtenido de una prueba como se describe en el ejemplo 8, donde el primer pico corresponde al material de flujo a través y el segundo pico corresponde a hIgG eludida.

La Figura 16 muestra gráficos que representan la capacidad de unión dinámica restante de las matrices según el ejemplo 8. De principio o fin, representan Z(N23T/N3A/N6D)dímero-Cys, Z(N23T/N3A)dímero-Cys, Z(N23T)dímero-Cys, y Z(N23T/IL4G)dímero-Cys respectivamente. Debido a problemas de software, se han perdido los dos últimos puntos de medida para Z(N23T/N3A)dímero-Cys.

Parte experimental

Abajo, la presente invención será descrita a modo de ejemplos, que se proporcionan sólo para propósitos ilustrativos y por consiguiente, no pretenden limitar el alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En esta parte, mientras que Z en su forma original ya tiene una estabilidad significativa pero no suficiente hacia un tratamiento alcalino, se asumió que pequeños cambios en la estabilidad debidos a las mutaciones pueden ser difíciles de ser llevados a cabo en ensayos de laboratorio. Por tanto, se usó un método supresor de mutaciones (Kotsuka, T., S. Akanuma, M. Tomuro, A. Yamagishi; and T. Oshima. 1996. Further stabilisation of 3-isopropylmalate dehydrogenase of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, by a suppressor mutation method. *J Bacteriol.* 178:723-727; and Sieber, V., A. Plückthun, and F.X. Schmidt. 1998. Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nature Biotechnology.* 16:955-960) para proporcionar un variante del dominio Z con una estabilidad estructural disminuida. Según esta estrategia, el variante desestabilizado de la proteína Z, llamado aquí Z(F30A) (Cedergren *et al.*, 1993, arriba) se usó como pasaje para la introducción posterior de mutaciones adicionales relacionadas con las investigaciones de estabilidad alcalina. Las propiedades de unión de este variante son similares a las de la proteína Z natural, mientras que F30A no está implicada en la unión Fc.

Además, Z_{wt} denota el dominio Z de tipo salvaje, que no contiene la sustitución F30A.

Estrategia experimental

Para analizar qué asparaginas en el dominio Z son responsables de su inestabilidad en condiciones alcalinas, se llevó a cabo un análisis mutacional. Con el fin de permitir la detección de mejoras con respecto a la estabilidad alcalina del dominio Z, se decidió usar un variante mutado, Z(F30A), mientras que el dominio Z todavía posee una estabilidad significativa pero no suficiente hacia condiciones alcalinas. Z(F30A) ha mostrado de forma temprana que posee una afinidad a IgG que es similar a la del tipo salvaje, pero también una estabilidad estructural marcadamente disminuida debido a la mutación de un aminoácido y que normalmente forma parte del núcleo hidrofóbico (Cedergren *et al.*, 1993; arriba; Jerdeberg, L., B. Person, R. Andersson, R. Karlsson, M. Uhlen, y B. Nilsson, 1995. Kinetic analysis of the interaction between protein A domain variants and human Fc using plasmon resonance detection. *Journal of Molecular Recognition.* 8:270-278). El dominio Z es un paquete de tres hélices que consiste de 58 aminoácidos, incluyendo ocho asparaginas (N3, N6, N11, N21, N28, N43 y N52) (Figura 1) (Nilsson, B., T. Moks, B. Jansson, L. Abrahmsen, A. Elmblad, E. Holmgren, C. Henrichson, T.A. Jones, and M. Uhlen. 1987. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng.* 1:107-113). Para evaluar el efecto de las distintas asparaginas en el ritmo de desactivación en condiciones alcalinas, siete de estos restos se intercambiaron por otros aminoácidos. Ya que N3 está localizada en el extremo amino terminal flexible del dominio, se excluyó del estudio. Se asumió que una degradación de este aminoácido no afectaría a la actividad de un ligando monomérico y con ello no sería detectable en el ensayo presente, que mide la actividad conservada. Además, ya que el aminoácido está localizado fuera de la parte estructurada del dominio, presumiblemente éste será fácilmente reemplazable durante la multimerización del dominio para conseguir una molécula del tipo proteína A. Para facilitar el diseño proteico, se hizo una comparación con las secuencias homólogas de los otros dominios de la proteína A (Figura 1) (Gulich *et al.*, 2000a). De la comparación, se decidió intercambiar asparagina 11 por una serina y 23 por treonina y finalmente 43 por un ácido glutámico. La asparagina 6 se intercambió por alanina mientras que la alternativa fue ácido aspártico cuando se mira las secuencias homólogas, que también ha mostrado ser sensible en condiciones alcalinas. Los cinco dominios de la proteína A tienen asparaginas en otras posiciones (21, 28, 52). Por ello, se intercambiaron por alaninas.

Ejemplo 1

Mutagénesis, expresión y purificación de la proteína Z mutante

Materiales y métodos

Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio usando una técnica de PCR en dos etapas (Higuchi *et al.*, 1988). Se usó el plásmido pDHZF30A (Cedergren *et al.*, 1993) como molde. Los oligonucleótidos que codifican para los distintos reemplazos de asparagina y el reemplazo A29G se sintetizaron por Interactiva (Interactiva Bio-technologie GmbH, Ulm, Alemania). Las enzimas de restricción XbaI y Hindi (MBI Fermentas Inc., Amhurst, NY) se usaron para clonación dentro del vector pDHZ (Jansson *et al.*, 1996) que se llevó a cabo según Sambrook (Sambrook *et al.*, 1987). Para crear pTrpZ, el dominio Z se amplificó por PCR, usando el plásmido pKN1 como molde (Nord *et al.*, 1995). El fragmento se restringió con XbaI y PstI y se ligó dentro del vector pTrpABDTIT2 (Kraulis *et al.*, 1996)

ES 2 325 362 T3

que ha sido restringido con las mismas enzimas. Se usó un Sistema de Secuenciación de ADN MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para verificar la secuencia correcta de los fragmentos insertados. Se utilizó un compuesto químico terminador MegaBACE (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) según las recomendaciones del fabricante en un protocolo de secuenciación en ciclo basado en el método dideoxi (Sanger *et al.*, 1977). Durante los procesos de clonación, se usó la cepa RR1ΔM15 de *Escherichia coli* (Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, MA), mientras para la expresión de diferentes productos génicos se usó la 017 (Olsson, M.O., y L.A. Isaksson 1979. Analysis of rpsD Mutations in *Escherichia coli*. I: Comparison of Mutants with Various Alterations in Ribosomal Protein S4. Molec. gen. Genet. 169:251-257).

La producción y purificación de Z(F30A) y las diferentes construcciones del mismo se llevaron a cabo según el protocolo subrayado por Gülich (Gülich *et al.*, 2000b, véase más arriba). La producción de Z y pZ(N23T) se llevó a cabo como se describe en Kraulis *et al* (Kraulis, P.J., P. Jonasson, P.-A. Nygren, M. Uhlén, L. Jendeborg, B. Nilsson, y J. Kördel. 1996. The serum albumin-binding domain of streptococcal protein G is a three-helix bundle: a heteronuclear NMR study. FEBS lett. 378:190-194). Se liofilizaron fracciones relevantes. La cantidad de proteína se estimó por medidas de absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de absorbancia específico, un ($1 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); Z 0.15.6; Z(N23T), 0.169; Z(F30A), Z(F30A,N43E), Z(F30A,N23T,N43E).0.157; Z(F30A,N6A), Z(F30A,N11S), Z(F30A,N21A), Z(F30A,N23T), Z(F30A,N28A), Z(F30A,N52A), Z(F30A,N6A,N23T), Z(F30A,N11S,N23T) 0.158.. La concentración se confirmó por análisis aminoacídico (BMC, Uppsala, Suecia). La homogeneidad se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227:680-685) usando el sistema Phast. Las proteínas liofilizadas se cargaron en geles de alta densidad (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) bajo condiciones reductoras y se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie según las recomendaciones del fabricante. La homogeneidad y lo pesos moleculares fueron además confirmados por espectrometría de masas.

Para espectroscopia CD, las muestras de proteína se prepararon en un tampón fosfato (K_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 , 1,9 mM, pH 7,5) a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Los espectros se grabaron usando un espectropolarímetro J-720 (JASCO, Tokio, Japón) en la región UV lejana de 250 a 200 nm a RT en una célula de cuarzo de longitud de senda de 0,1 cm y con una velocidad de escáner de 10 nm min^{-1} . Cada espectro era la media de los cinco escáneres acumulados y el espectro final se convirtió en elipticidad de resto medio (ERM) ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

Resultados (ejemplo 1)

Todas las variantes Z se produjeron con éxito de forma intracelular en *E. coli* a 37°C y mostraron los mismos niveles de expresión, aproximadamente 50 mg/l como se estimó por SDS-PAGE. Todas las proteínas se purificaron por cromatografía por afinidad con IgG. Tras la purificación, las muestras se analizaron con SDS-PAGE (datos no mostrados), se liofilizaron y se almacenaron para análisis posteriores. La masa molecular para la proteína Z y los distintos mutantes de la misma también se confirmaron por espectrometría de masas. Los datos confirmaron un correcto contenido en aminoácidos para todos los mutantes (datos no mostrados). También, se llevaron a cabo análisis estructurales en un equipo de Dicronismo Circular (DC), mientras que se ha demostrado previamente ser adecuado para detectar cambios estructurales en proteínas α helicoidales (Johnson, C.W., Jr. 1990. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. Proteins. 7:205-214; and Nord, K., J. Nilsson, B. Nilsson, M. Uhlén, and P.-Å. Nygren. 1995. A combinatorial library of an α -helical bacterial receptor domain. Prot. eng. 8:601-608). Todos los espectros muestran un mínimo a 208 nm a 222 nm en combinación con un máximo alrededor de 195 nm, que indica una estructura similar para los mutantes y la molécula pariente. Sin embargo, Z(F30A, N52A) parece que tiene una forma helicoidal α inferior que Z de tipo salvaje y los otros mutantes del mismo (datos no mostrados).

Ejemplo 2

50 Análisis de interacción bioespecífica

Materiales y métodos

Se detectaron diferencias en las constantes de afinidad y cinética de los estados de asociación y disociación en un instrumento Biacore™ 2000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron IgG policlona humana y HSA (referencia negativa) por acoplamiento amino sobre la capa de dextrano carboxilado de un chip sensor CM5 (Biacore) según las recomendaciones del fabricante. La inmovilización de IgG dio como resultado aproximadamente 2000 RU. Z, ZF30A, y los diferentes mutantes se prepararon en HBS (HAPES 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 3,4 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, pH 7,4) a 10 concentraciones diferentes ($100\text{-}550 \text{ nM}$). Las muestras se inyectaron sobre las superficies por duplicado en orden al azar a un ritmo de flujo de $30 \mu\text{l min}^{-1}$. Se usó HCl 10 mM para regenerar la superficie. Los datos se analizaron usando el software 3.0.2b de evaluación BIA (Biacore BIA). Las señales a partir de una superficie control inmovilizada con HSA se sustrajeron de la superficie de IgG. Se asumió un modelo 1:1 de Langmuir y se calcularon las constantes cinéticas aparentes y también las constantes de afinidad. También, se calculó el cambio en la energía de unión libre ($\Delta\Delta G = -RT \ln K_{\text{aff, mutante}}/K_{\text{aff, nativa}}$) en relación a la molécula natural.

65

ES 2 325 362 T3

Resultados (ejemplo 2)

Para determinar las diferencias en la afinidad para las variantes de Z hacia IgG, se llevó a cabo una resonancia de superficie en plasmón (RSP) usando un Biacore. El objetivo era comparar la afinidad para las distintas variantes de Z mutado según la invención con la molécula pariente. Como se menciona más arriba, debido a la alta estabilidad alcalina del dominio Z pariente se decidió usar un variante estructural desestabilizado de Z que incluye la mutación F30A (Cedergren, L., R. Andersson, B. Jansson, M. Uhlén, and B. Nilsson. 1993. Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein eng.* 6:441-448). Por lo tanto, era de importancia confirmar primero que la afinidad entre la molécula mutada e IgG estaba mantenida a pesar de la mutación. Como se puede ver en la Tabla 1 más abajo, la afinidad de Z(F30A) no está afectada de forma significativa. El pequeño cambio en la afinidad proporciona una estabilidad ligeramente superior al complejo de Z(F30A) e IgG en comparación con la molécula Z pariente e IgG. Esto está en consonancia con resultados descritos anteriormente por Jendeberg *et al.* (Cedergren *et al.*, 1993, arriba; Jederberg *et al.*, 1995, arriba). Todos los mutantes construidos con Z(F30A) como andamio se analizaron y compararon con su molécula pariente (Z(F30A)). Los resultados muestran que la afinidad global no está afectada de forma significativa por las mutaciones, indicando que ninguna de las mutaciones en asparagina según la invención son muy importantes para la unión a IgG (véase Tabla 1 abajo). En todas las variantes de Z, incluyendo la mutación N21A o N43E, sólo se observó una constante de afinidad ligeramente inferior. Para mutantes con la mutación N23T, sorprendentemente, la afinidad incluso parece ser ligeramente superior. También, en el caso de la mutación N28A, el descenso en la afinidad es muy pequeño, y no se puede esperar que tenga influencia esencial si la proteína mutante se usa, por ejemplo, como proteína ligando. Además, todas las construcciones que incluyen la mutación N28A tienen una constante de disociación notablemente aumentada. Para los mutantes que incluyen la mutación N23T afinidad un tanto aumentada parece que se debe a una constante de asociación ligeramente aumentada. También, la mutación N6A da una constante de asociación superior, pero la constante de afinidad no está afectada debido a la constante de disociación aumentada que también se da en la mutación.

TABLA 1

Una visión general del estudio cinético de los distintos dominios Z llevados a cabo usando Biacore					
Mutante	Kon [10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹]	Koff [10 ⁻³ s ⁻¹]	Kaf [110 ⁷ M ⁻¹]	ΔΔG (vs Zwt) [kcal/mol]	ΔΔG (vs Z(F30A)) [kcal/mol]
Zwt	1,5	3,7	4,0	0	
Z(N23T)	2,7	3,9	7	-0,3	
Z(F30A)	1,9	4,17	4,5	-0,1	0,0
Z(F30A,N6A)	7	21	3,3	0,1	0,2
Z(F30A,N11S)	1,6	4,9	3,2	0,1	0,2
Z(F30A,N21A)	1	3,8	2,6	0,3	0,4
Z(F30A,N23T)	2,1	3,75	5,6	-0,2	-0,1
Z(F30A,N28A)	3,1	9,87	3,2	0,1	0,2
Z(F30A,N43E)	1,5	5,1	2,6	0,3	0,4
Z(F30A,N52A)	1,5	4,9	3	0,2	0,3
Z(F30A,N23T,N43E)	0,8	3,8	2	0,4	0,5

Z_{wt} se usó como control interno durante las distintas medidas. Las diferencias en energía de unión libre se calcularon en relación a Zwt y Z(F30A) respectivamente

Ejemplo 3

*Estabilidad hacia condiciones alcalinas*5 *Materiales y métodos*

El comportamiento de las variantes del dominio Z como ligandos de afinidad se analizó por inmovilización en una matriz de afinidad clásica. Z, Z(F30A) y las variantes mutadas se acoplaron de forma covalente a columnas de afinidad HiTrap™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) usando el compuesto químico N-hidroxisuccinimida según las recomendaciones del fabricante. Las columnas se pulsaron con TST y HAc 0,2 M, pH 3,1. se preparó e inyectó en las columnas en exceso IgG policlonal humana en TST. Se siguió un protocolo de cromatografía por afinidad clásico durante 16 ciclos en AktaTMEexplorer 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Entre cada ciclo se integró una etapa CIP. El agente limpiador fue NaOH 0,5 M y el tiempo de contacto para cada pulso fue de 30 minutos, dando como resultado un tiempo de exposición total de 7,5 horas. El material eluido se detectó a 280 nm.

Resultados (ejemplo 3)

Z, Z(F30A) y mutantes de los mismos se unieron de forma covalente a columnas HiTrap™ usando un compuesto químico NHS. Se cargó IgG en exceso y la cantidad de IgG eluido se midió tras cada ciclo para determinar la capacidad total de la columna. Entre cada ciclo las columnas se expusieron a tratamiento CIP que consiste de NaOH 0,5 M. Tras 16 pulsos, con un tiempo de exposición total de 7,5 horas, la columna con Z(F30A)-matriz muestra un 70% de disminución de la capacidad. Los datos de degradación en la Figura 2a sugieren que cuatro de las asparaginas intercambiadas (N6, N11, N43 y N52) son menos sensibles a las condiciones alcalinas que los mutantes expuestos para este experimento. Por el contrario, N23 parece que es muy importante para la estabilidad de Z (F30A). Z(F30A,N23T) muestra sólo un 28% de disminución de la capacidad a pesar de la mutación desestabilizante F30A. Por consiguiente, Z(F30A,N23T) es casi tan estable como Z_{wt} y por ello la variante más estabilizada con Z(F30A) como andamio. El dominio Z(F30A) con dos mutaciones adicionales Z(F30A,N23T,N43E) también muestra el mismo patrón de degradación que Z(F30A,N23T). Un intercambio de N28 a una alanina mejora la estabilidad de Z(F30A) hacia condiciones alcalinas. Sorprendentemente, la columna con Z(F30A,N21A) como ligando de afinidad revela una pérdida dramática de capacidad cuando se expone a NaOH en comparación con la molécula pariente. Estos datos hacen a Z(N23T) un candidato muy ventajoso como ligando en la purificación por afinidad de IgG.

Para demostrar finalmente la fiabilidad de la estrategia usando una variante estructuralmente desestabilizada de un molécula con el fin de hacer pequeños cambios en la estabilidad detectable, la mutación N23T se injertó dentro del dominio Z pariente. El dominio Z pariente y Z(N23T) se acoplaron a columnas HiTrap™ y se expusieron a condiciones alcalinas del mismo modo que para los mutantes ya mencionados. Como se puede ver en la figura 2b, el mutante Z (N23T) muestra estabilidad superior a Z_{wt} cuando se expone a pH superior.

Ejemplo 4

Construcción de monómeros de mutantes Z con y sin una cisteína C-terminal

Se introdujeron tres mutaciones diferentes en un gen que codifica Z(N23T): K4G, N3A y la mutación doble N3A/N6D.

Las mutaciones se introdujeron originalmente dentro de dos vectores diferentes: uno con una cisteína en el extremo C-terminal y una sin la cisteína. Esto se hizo para facilitar posteriormente la construcción de multímeros con una sola cisteína en el extremo C-terminal.

Ejemplo 4(a)

55 *Construcción del monómero que contiene cisteína*

Como molde para la construcción, se usó un plásmido denominado “pGEM ZN23T”. Este ya contenía la mutación N23T en el gen Z.

60

65

ES 2 325 362 T3

Se llevó a cabo una reacción de PCR con este plásmido como molde y los dos oligonucleótidos.

5 AFFI-63: TTT TTT GTA GAC AAC GGA TTC AAC AAA GAA C
 GRTO-40: GAT CTG CTG CAG TTA GCA TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT
TAG
10 para la mutación K4G,
 AFFI-64: TTT TTT GTA GAC GCC AAA TTC AAC AAA GAA C
 GRTO-40: GAT CTG CTG CAG TTA GCA TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT
15 TAG
 para la mutación N3A y,
20 AFFI-65: TTT TTT GTA GAC GCC AAA TTC GAC AAA GAA C
 GRTO-40: GAT CTG CTG CAG TTA GCA TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT
 TAG
25 para la mutación N3A/N6D.

30 Los tubos de la reacción de PCR contienen: 0,5 μ l de molde pGEM ZN23T [500 ng/ μ l], 5 pmol de cada cebador
(Interactiva, Thermo Hybaid GmbH, Ulm, Alemania), 5 μ l de mezcla de dNTPs ([10 mM], Applied Biosystems,
CA, USA), 5 μ l de tampón de PCR 10x (Applied Biosystems, CA, USA), 0,1 μ l de AmpliTaq ([5 U/ μ l], Applied
Biosystems, CA, USA) y agua estéril hasta un volumen final de 50 μ l. El programa de PCR consistía en 2 min a 94°C
seguido por 30 ciclos de 15 seg a 96°C, 15 seg a 50°C, 1 min a 72°C y finaliza con un minuto adicional a 72°C. Las
reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Sistema de PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA,
35 USA).

 El producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% tras confirmar la obtención de un producto de tamaño
correcto, se purificó con el kit de purificación de PCR QIAquick® (QIAGEN GMBH, Hilden, Alemania).

40 Los productos de PCR se escindieron según Sambrook (Sambrook *et al.*) con las enzimas de restricción *AccI* y
PstI (New England Biolabs, NEB, MA, USA). Los productos de escisión se analizaron en un gel de agarosa y se
purificaron de la agarosa con el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (QIAGEN GMBH, Hilden, Alemania) antes
de la ligación. Los fragmentos se ligaron dentro de un vector denominado “pTrp-protA-stab-(multi9)”, ya escindido
con las enzimas *AccI* y *PstI* y purificado, añadiendo la ADN ligasa T4 y el tampón de ligación (MBI Fermentas,
45 Lituania), y transformado posteriormente dentro de células RRIΔM15 (ATCC, MA, USA). A las construcciones se
les dio en nombre pAY87 (Z(N23T/K4G)-Cys), pAY89 (Z(N23T/N3A)-Cys) y pAY91 (Z(N23T/N3A/N6D)-Cys),
respectivamente.

50 Se usó un Sistema de Secuenciación de ADN MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para
verificar las secuencias correctas de fragmentos insertados. Se utilizó el compuesto químico terminador MegaBACE™
(Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) según las recomendaciones del fabricante en un protocolo de secuenciación
en ciclo basado en el método didesoxi (Sanger *et al.*, 1977).

Ejemplo 4(b)

55 Construcción del monómero que no contiene cisteína

 Como molde para la construcción, se usó un plásmido denominado “pTrp(-N)ZN23T-Cys”. Este plásmido ya
contenía el gen con la mutación N23T.

60

65

ES 2 325 362 T3

Se llevó a cabo una reacción de PCR con este plásmido como molde y los dos oligonucleótidos

5 AFFI-63: TTT TTT GTA GAC AAC GGA TTC AAC AAA GAA C
 GRTO-41: GAT CTC GTC TAC TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT TAG
 para la mutación K4G,
10 AFFI-64: TTT TTT GTA GAC GCC AAA TTC AAC AAA GAA C
 GRTO-41: GAT CTC GTC TAC TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT TAG
 para la mutación N3A y,
15 AFFI-65: TTT TTT GTA GAC GCC AAA TTC GAC AAA GAA C
 GRTO-41: GAT CTG CTG CAG TTA GCA TTT CGG CGC CTG AGC ATC ATT
20 TAG
 para la mutación N3A/N6D.

25 Los tubos de la reacción de PCR contienen: 0,5 μ l de molde pTrp(-N)ZN23T-Cys [500 ng/ μ l], 5 pmol de cada cebador (Interactiva, Thermo Hybaid GmbH, Ulm, Alemania), 5 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM, Applied Biosystems, CA, USA), 5 μ l de tampón de PCR 10x (Applied Biosystems, CA, USA), 0,1 μ l de AmpliTaq ([5 U/ μ l], Applied Biosystems, CA, USA) y agua estéril hasta un volumen final de 50 μ l. El programa de PCR consistía en 2 min a 94°C seguido por 30 ciclos de 15 seg a 96°C, 15 seg a 50°C, 1 min a 72°C y finaliza con un minuto adicional a 72°C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Sistema de PCR GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA).

30 Los productos de PCR se clonaron directamente TA dentro del vector pGEM según las recomendaciones del fabricante (Promega, WI, USA) y se transformaron posteriormente dentro de células RRI Δ M15 (ATCC, MA, USA). A las construcciones se les dio en nombre pAY86 (Z(N23T/K4G), pAY88 (Z(N23T/N3A) y pAY90 (Z(N23T/N3A/N6D), respectivamente.

35 Se usó un Sistema de Secuenciación de ADN MegaBACE[™] 1000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para verificar las secuencias correctas de fragmentos insertados. Se utilizó el compuesto químico terminador MegaBACE[™] (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) según las recomendaciones del fabricante en un protocolo de secuenciación en ciclo basado en el método didesoxi (Sanger *et al.*, 1977).

45 Ejemplo 5

Construcción del gen que codifica monómeros y oligómeros con una cisteína en el extremo C-terminal en el vector pTrp

50 Todos los plásmidos arriba descritos de pAY86 a pAY91 (un total de seis plásmidos) se escindieron con la enzima de restricción *AccI*. Esto dio como resultado la liberación de mutantes Z completamente a partir de vectores pAY86, pAY88 y pAY90 y una sola abertura en el extremo 3' del gen en los vectores pAY87, pAY89 y pAY91. Los vectores escindidos se trataron con Fosfatasa Alcalina de Intestino de Ternera (CIAP, MBI Fermentas, Lituania) según las recomendaciones del fabricante. Esta etapa se llevó a cabo para defosforilar los extremos 5' para evitar autoligación de los vectores.

55 Los fragmentos del mutante Z liberados se analizaron en un gel de agarosa y se purificaron posteriormente de la agarosa antes de ligar los fragmentos dentro de vectores abiertos según lo siguiente:

60 Fragmento de pAY86 a pAY87

 Fragmento de pAY88 a pAY89

 Fragmento de pAY90 a pAY91

65 Para las reacciones de ligación, se mezclaron diferentes proporciones de fragmento frente al vector y el resultado fue que se obtuvo un intervalo de multímeros diferentes, como se esperaba, en un intervalo de dímeros a pentámeros.

ES 2 325 362 T3

Los diferentes multímeros se transformaron dentro de células RRIΔM15 (ATCC, MA, USA) y las secuencias correctas se verificaron por análisis en un equipo de secuenciación en el Instituto Real de Tecnología tal como se describe más arriba. Los plásmidos nuevamente construidos se denominaron como se muestra en la tabla de más abajo:

5

TABLA 2

10

Compendio de plásmidos construidos	
Plásmido no. pA	Proteína expresada a partir de la construcción
86	Z(N23T/K4G)
87	Z(N23T/K4G)-Cys
88	Z(N23T/N3A)
89	Z(N23T/N3A)-Cys
90	Z(N23T/N3A/N6D)
91	Z(N23T/N3A/N6D)-Cys
92	Z(N23T/K4G)dímero-Cys
93	Z(N23T/N3A)dímero-Cys
94	Z(N23T/N3A/N6D)dímero-Cys
95	Z(N23T/K4G)trímero-Cys
96	Z(N23T/N3A)trímero-Cys
97	Z(N23T/N3A/N6D)trímero-Cys
98	Z(N23T/K4G)tetrámero-Cys
99	Z(N23T/N3A)tetrámero-Cys
100	Z(N23T/N3A/N6D)tetrámero-Cys
101	Z(N23T/K4G)pentámero-Cys
102	Z(N23T/N3A)pentámero-Cys
103	Z(N23T/N3A/N6D)pentámero-Cys

15

20

25

30

35

40

45

50 Los vectores plasmídicos arriba descritos, excepto pAY86, pAY88 y pAY90 tienen el promotor Trp, la secuencia líder Trp y el gen para la resistencia a kanamicina (Km). pAY86, pAY88 y pAY90 tienen un gen para resistencia a ampicilina en su lugar.

55 Ejemplo 6

Construcción de genes que codifican monómeros y oligómeros con una cisteína en el extremo C-terminal en el vector pK4

60 Los genes que codifican las proteínas enumeradas en la Tabla 2 se transfirieron a un vector que contiene el promotor SPA y una secuencia señal. Para permitir este procedimiento, se construyó un adaptador que contiene el sitio de escisión para la enzima de restricción *KpnI* (New England Biolabs, NEB, MA, USA). El adaptador se construyó por los dos oligonucleótidos (Interactiva, Termo Hybaid GMBH, Ulm, Alemania).

65 El plásmido pAY104 (pK4-Cys-ABDstabdímero) se escindió con *FspI* y *PstI* (New England Biolabs, NEB, MA, USA). El vector se purificó en un gel de agarosa y se separó el fragmento liberado y el vector restante se purificó del gel de agarosa con el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania).

ES 2 325 362 T3

Los dos oligómeros AFFI-88 y AFFI-89 se mezclaron en un tampón de ligación (MBI Fermentas, Lituania) y se calentaron a 50°C y la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente tras lo cual el vector plasmídico escindido se añadió junto con la ADN ligasa T4 (MBI Fermentas, Lituania). Tras la reacción de ligación, el producto se transformó dentro de células RRIΔM15 y se verificó la secuencia correcta como se describe más arriba. El plásmido resultante se denominó pAY128.

El plásmido pAY128 luego se escindió con las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI* y el vector escindido se analizó en un gel de agarosa y se purificó posteriormente con el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Los fragmentos que expresan los dos genes Z mutados Z(N23T/N3A) y Z(N23T/N3A/N6A) de pAY86 a pAY103 se escindieron con *KpnI* y *PstI* (New England Biolabs, NEB, MA, USA), se separaron y purificaron tras separación en un gel de agarosa. Los distintos fragmentos se ligaron dentro del vector escindido originado de pAY128 y los plásmidos resultantes fueron, tras verificar las secuencias correctas, denominados pAY107 a pAY116 tal como se enumera en la Tabla 3.

TABLA 3

Compendio de plásmidos construidos con el promotor SPA y la secuencia señal	
Plásmido no. PRAY	Proteína expresada a partir de la construcción
107	Z(N23T/N3A)-Cys
108	Z(N23T/N3A/N6D)-Cys
109	Z(N23T/N3A)dímero-Cys
110	Z(N23T/N3A/N6D)dímero-Cys
111	Z(N23T/N3A)trímero-Cys
112	Z(N23T/N3A/N6D)trímero-Cys
113	Z(N23T/N3A)tetrámero-Cys
114	Z(N23T/N3A/N6D)tetrámero-Cys
115	Z(N23T/N3A)pentámero-Cys
116	Z(N23T/N3A/N6D)pentámero-Cys

Ejemplo 7

Construcción de genes que codifican una parte del gen E (E') a partir de la proteína A fusionada en el extremo N-terminal a monómeros y oligómeros con una cisteína en el extremo C-terminal en el vector pK4

Los genes que codifican las proteínas, como se enumeran en la Tabla 2, se transfirieron a un vector que contiene el promotor SPA y la secuencia señal y una parte del gen que codifica la región E de la proteína A (E'). Se ha mostrado anteriormente que una adición del extremo N-terminal de la parte de unión a IgG de la proteína A madura (región E), o partes de la misma, pueden aumentar el correcto procesamiento y también facilitar la secreción del producto génico al medio de cultivo circundante (Abrahmsé *et al.*, 1985). Se construyó por los dos oligonucleótidos un adaptador que contiene el sitio de escisión para la enzima de restricción *KpnI* y una parte de la región E de la proteína A (E') (Interactiva, Termo Hybaid GMBH, Ulm, Alemania).

El Plásmido pAY104 (pK4-cys-ABDstadbímero) se escindió con *FspI* y *PstI* (New England Biolabs, NRB, MA, USA). El vector se purificó en un gel de agarosa y se separó el fragmento liberado y el vector restante se purificó de la agarosa con el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Los dos oligonucleótidos se mezclaron en un tampón de ligación y se calentaron a 75°C y la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente tras añadir el vector plasmídico escindido, junto con ADN ligasa T4 (MBI Fermentas, Lituania). Tras la reacción de ligación, el producto se transformó dentro de células RRIΔM15 y la secuencia correcta se verificó como se describe más arriba. El plásmido resultante se denominó pAY129.

El Plásmido pAY129 luego se escindió con las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI* y el vector escindido se analizó en un gel de agarosa y se purificó posteriormente de la agarosa con el Kit de Extracción en Gel QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Los fragmentos que expresan los dos genes Z mutados Z(N23T/N3A) y Z

ES 2 325 362 T3

(N23T/N3A/N6A) de pAY86 a pAY103 se escindieron con *KpnI* y *PstI*, se separaron y purificaron tras la separación de la agarosa. Los distintos fragmentos se ligaron dentro de un vector escindido originario de pAY129 y los plásmidos resultantes, tras verificar las secuencias correctas, se denominaron pAY118 a pAY127 como se enumera en la Tabla 4.

5

TABLA 4

10

Compendio de plásmidos contruidos con el promotor SPA y la secuencia señal y una parte de la región E de la proteína A – E'	
Plásmido no. PRAY	Proteína expresada a partir de la construcción
118	E'-Z(N23T/N3A)-Cys
119	E'-Z(N23T/N3A/N6D)-Cys
120	E'-Z(N23T/N3A)dímero-Cys
121	E'-Z(N23T/N3A/N6D)dímero-Cys
122	E'-Z(N23T/N3A)trímero-Cys
123	E'-Z(N23T/N3A/N6D)trímero-Cys
124	E'-Z(N23T/N3A)tetrámero-Cys
125	E'-Z(N23T/N3A/N6D)tetrámero-Cys
126	E'-Z(N23T/N3A)pentámero-Cys
127	E'-Z(N23T/N3A/N6D)pentámero-Cys

15

20

25

30

Ejemplo 8

35

Estabilidad hacia condiciones alcalinas

Para evaluar la estabilidad de las proteínas hacia condiciones alcalinas, se ensayaron cuatro proteínas diferentes en un medio ambiente de pH alto. Las distintas proteínas fueron Z(N23T)dímero-Cys, Z(N23T/K4G)dímero-Cys, Z(N23T/N3A)dímero-Cys y Z(N23T/N3A/N5D)dímero-Cys.

40

(Z(N23T)dímero-Cys), (Z(N23T/N3A) dímero -Cys), (Z(N23T/N3A/N6D) dímero -Cys) y (Z(N23T/K4G)dímero-Cys se cultivaron en fermentadores. El medo de cosecha se purificó y acopló a Agarosa HF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) usando métodos clásicos antes de los ensayos alcalinos. Las proteínas acopladas a la agarosa HF se denominaron como sigue

45

- Z(N23T) dímero-Cys U631049
- Z(N23T/K4G)dímero-Cys U631079
- Z(N23T/N3A)dímero-Cys U631064
- Z(N23T/N3A/N6D)dímero-Cys U631063

50

55

La matrices se empaquetaron en columnas (HR 5/2, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) hasta un volumen final en un intervalo de 0,1 a 0,3 ml. El equipo de purificación usado fue ÄKTA™ Explorer 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) con una celda de flujo UV de muestra de 2 mm (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

60

Los tampones usados contenían

- *Tampón de prueba:* Tris-HCl 25 mM, EDTA1 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,05%, acetato amónico 5 mM, pH 8,0
- *Tampón de elución:* ácido acético 0,2 M (HAc), pH 3,1
- *Tampón de Limpieza en el Lugar (CIP):* NaOH 0,5 M

65

ES 2 325 362 T3

Un típico ciclo de prueba cromatográfica consiste de

- Equilibrado de la columna con tampón de prueba
- Aplicación de la muestra de 10 mg de IgG policlonal humana a 0,2 ml/min
- Lavado intenso de proteínas no unidas
- Elución a 1,0 ml/min con tampón de elución
- Re-equilibrado con tampón de prueba
- Limpieza en el Sitio (CIP) con tampón CIP con un tiempo de contacto entre la matriz de la columna y NaOH 0,5 M de 1 hora
- Re-equilibrado con tampón de prueba

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La cantidad de IgG cargada en cada prueba fue por encima de la capacidad de unión dinámica total de la columna ya que el camino de las proteínas no unidas era considerable cuando se carga la muestra dentro de la columna en todos los casos. Tras un ciclo, que incluyen las etapas de más arriba, se empezó un nuevo ciclo que, de nuevo, incluía una hora de exposición de hidróxido sódico 0,5 M. Para medir la disminución de la capacidad de unión dinámica de la columna, se comparó el área de pico del pico eluido con el área de pico del pico eluido cuando la matriz no había sido expuesta al hidróxido sódico. Considerando el área de pico original como 100% de la capacidad de unión, se observó el descenso de la capacidad de unión de hIgG. El área de pico se calculó con el software UNICORN™ que acompaña al sistema de purificación.

Cada ciclo se repitió 21 veces, dando como resultado una exposición total entre la matriz y el hidróxido sódico de 20 horas para cada matriz diferente. Las áreas de pico normalizadas se vieron en una gráfica como se puede ver más abajo (Figura 16). Todos los 21 ciclos se repitieron para cada mutante.

Z(N23T/N3A/N6D)dímero-Cys y Z(N23T/N3A)dímero-Cys mostraron estabilidad mejorada frente a condiciones alcalinas en comparación con Z(N23T)dímero-Cys originalmente producido.

ES 2 325 362 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de unión a inmunoglobulina capaz de unirse a regiones de una molécula de inmunoglobulina distintas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), donde dicha proteína comprende dos o más unidades que se repiten como se define por SEQ ID NO: 1 o 2, en la que el resto de aminoácido en posición 23 en cada unidad es una treonina.
- 10 2. Una proteína según la reivindicación 1, que es una proteína de unión al fragmento Fc.
- 10 3. Una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las unidades están unidas por elementos comprendidos por hasta aproximadamente 15 aminoácidos.
- 15 4. Una proteína según la reivindicación 3, donde el elemento de unión comprende la secuencia VDAFKD.
- 15 5. Una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que también comprende una o más unidades que se repiten que comprenden los dominios E, D, A, B y C de la proteína A de *Staphylococcus*.
- 20 6. Una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un tetrámero.
- 20 7. Una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos una unidad comprende al menos el 80% de la secuencia definida por SEQ ID NO: 4.
- 25 8. Una proteína según la reivindicación 7, que es un tetrámero donde al menos una unidad comprende la secuencia definida por SEQ ID NO: 4.
- 25 9. Una proteína según la reivindicación 7 u 8, que es un tetrámero donde el elemento de unión comprende la secuencia VDAKFD.
- 30 10. Un ácido nucleico que codifica una proteína tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 30 11. Un sistema de expresión, que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 10.
- 35 12. Una matriz para cromatografía por afinidad, donde una pluralidad de ligandos que comprenden proteínas de unión a inmunoglobulinas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 han sido acopladas a un soporte sólido.
- 35 13. Una matriz según la reivindicación 12, donde los ligandos comprenden uno o más tetrámeros.
- 40 14. Una matriz según la reivindicación 12 o 13, donde los ligandos han sido acoplados al soporte por enlace tioéter.
- 40 15. Una matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, donde el soporte es un material de polisacárido.
- 45 16. Una matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, que proporciona unión selectiva de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA e IgM, preferiblemente IgG.
- 45 17. Uso de una matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 12-16 en el aislamiento cromatográfico de una inmunoglobulina, cuyo uso comprende las etapas de adsorber la inmunoglobulina a la matriz; eluir dicha inmunoglobulina; limpiar la matriz con álcali; adsorber una inmunoglobulina a la matriz lavada, y eluir la inmunoglobulina.
- 50 18. Uso según la reivindicación 17, donde la limpieza es llevada a cabo con NaOH a una concentración de hasta aproximadamente 1 M, tal como aproximadamente 0,5 M.
- 50 19. Un proceso de cromatografía, donde al menos un compuesto diana es separado de un líquido por adsorción a una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o a una matriz según una cualquiera de las reivindicaciones 12-16.
- 55 20. Un proceso según la reivindicación 19, donde el compuesto diana es una inmunoglobulina.

60

65

Figura 1

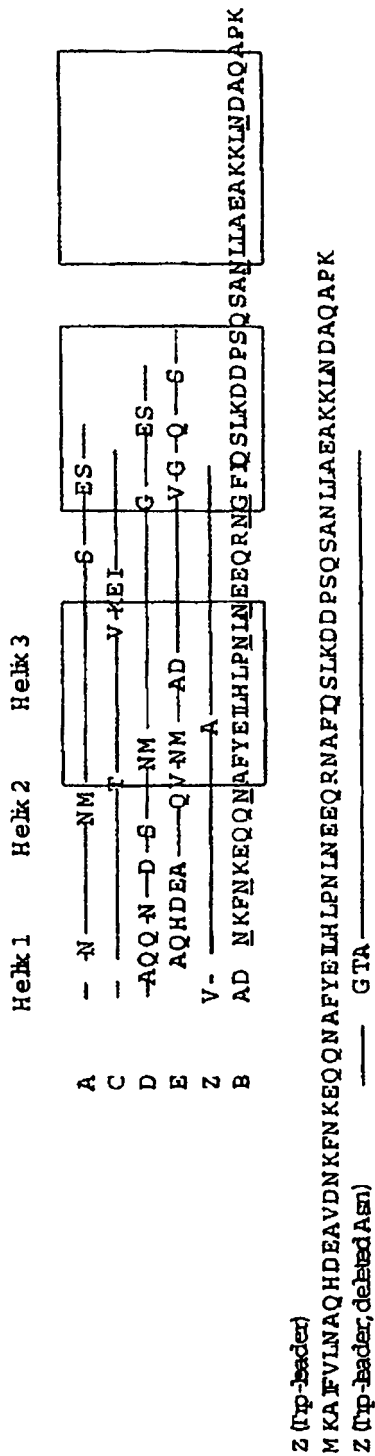


Figura 2a

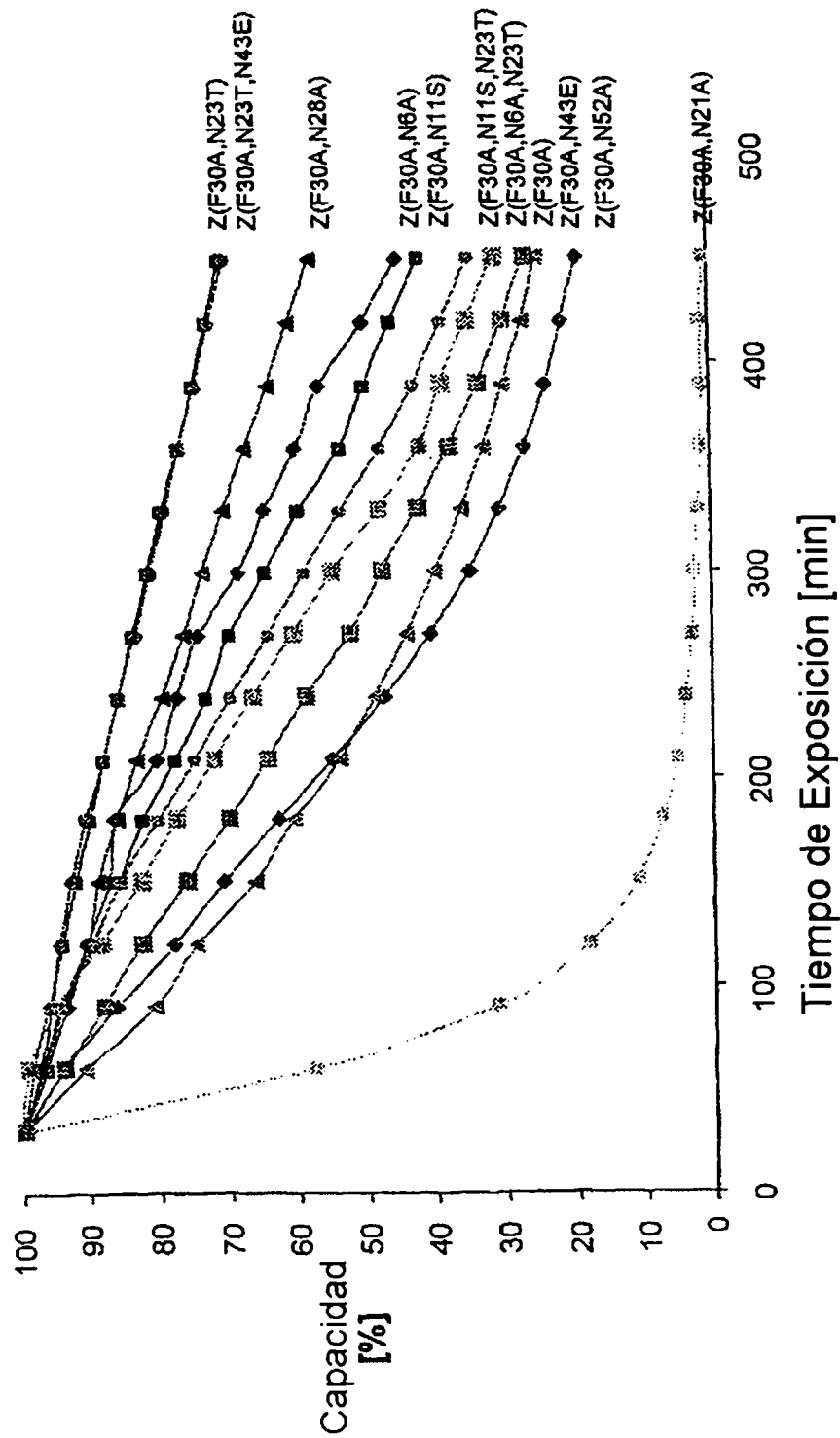


Figura 2b

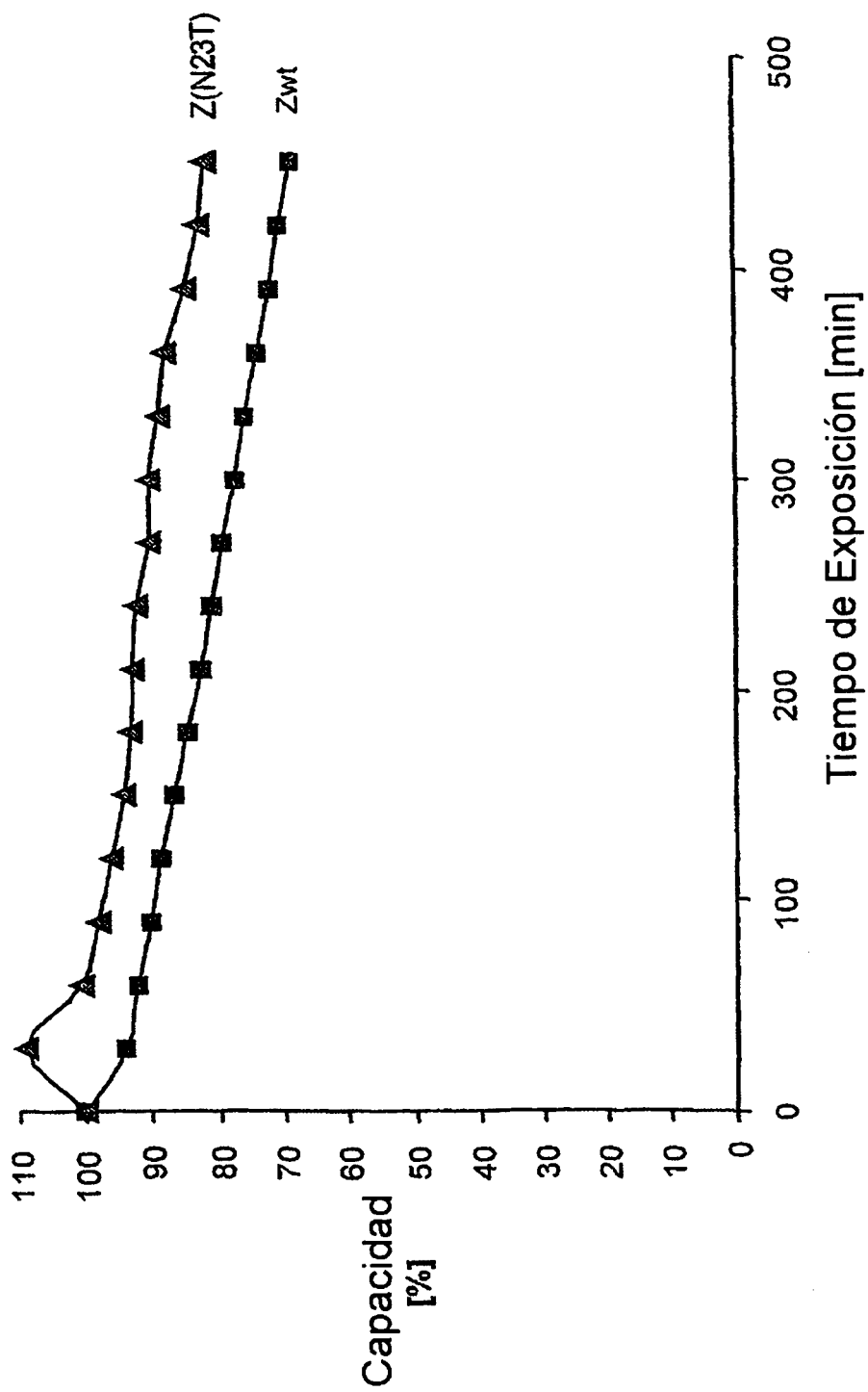


Figura 3:

```

      KpnI
-----
      AccI
-----
L  G  T  V  D  A* K  F  D* K  E  Q  Q  N  A  P  Y  E  I  L
CTG GGT ACC GTA GAC GGC AAA TTC GAC AAA GAA CAA CAA AAC GCG TTC TAT GAG ATC TTA
GAC CCA TGG CAT CTG CGG TTT AAG CTG TTT CTT GTT GTT TTG CGC AAG ATA CTC TAG AAT

H  L  P  N  L  T* E  E  Q  R  N  A  F  I  Q  S  L  K  D  D
CAT TTA CCT AAC TTA ACT GAA GAA CAA CGA AAC GCC TTC ATC CAA AGT TTA AAA GAT GAC
GTA AAT GGA TTG AAT TGA CTT CTT GTT GCT TTG CGG AAG TAG GTT TCA AAT TTT CTA CTG

P  S  Q  S  A  N  L  L  A  E  A  K  K  L  N  D  A  Q  A  P
CCA AGC CAA AGC GCT AAC CTT TTA GCA GAA GCT AAA AAG CTA AAT GAT GCT CAG GCG CCG
GGT TCG GTT TCG CGA TTG GAA AAT CGT CTT CGA TTT TTC GAT TTA CTA CGA GTC CGC GGC

      PstI
-----
K  C  .  L  Q  L
AAA TGC TAA CTG CAG CTC
TTT ACG ATT GAC GTC GAG
    
```

Figura 4:

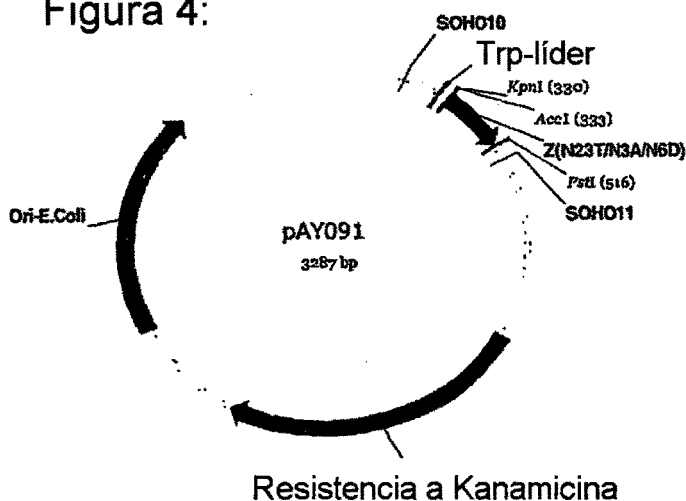


Figura 5:

AccI

V D A* K F D* K E Q Q N A F Y E I L
 TTT TTT GTA GAC GCC AAA TTC GAC AAA GAA CAA CAA AAC GCG TTC TAT GAG ATC TTA
 AAA AAA CAT CTG CGG TTT AAG CTG TTT CTT GTT GTT TTG CGC AAG ATA CTC TAG AAT

H L P N L T* E E Q R N A F I Q S L K D D
 CAT TTA CCT AAC TTA ACT GAA GAA CAA CGA AAC GCC TTC ATC CAA AGT TTA AAA GAT GAC
 GTA AAT GGA TTG AAT TGA CTT CTT GTT GCT TTG CGG AAG TAG GTT TCA AAT TTT CTA CTG

P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P
 CCA AGC CAA AGC GCT AAC CTT TTA GCA GAA GCT AAA AAG CTA AAT GAT GCT CAG GCG CCG
 GGT TCG GTT TCG CGA TTG GAA AAT CGT CTT CGA TTT TTC GAT TTA CTA CGA GTC CGC GGC

AccI

K -----
 AAA GTA GAC AAA AAA
 TTT CAT CTG TTT TTT

Figura 6:

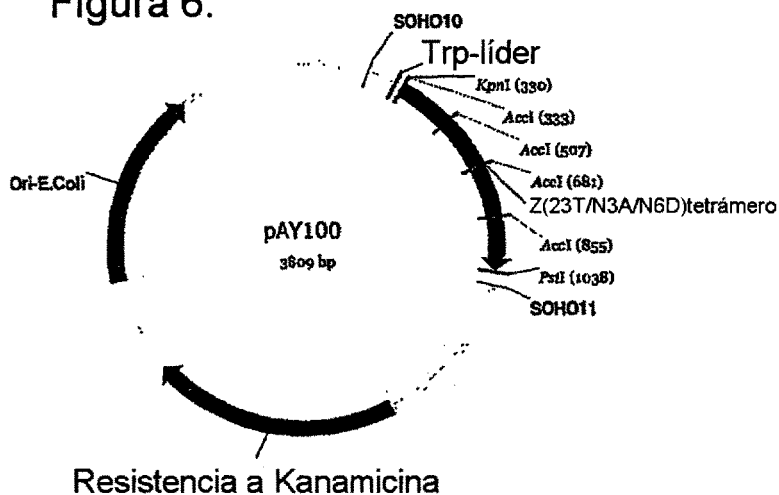


Figura 7:

AFFI-88: PO₃²⁻-GCA GGG TAC CCT GCA
 AFFI-89: GGG TAC CCT GC

KpnI

 PO₃²⁻-GCAGGGTACC CTGCA
 CGTCCCATGG G

Figura 8:

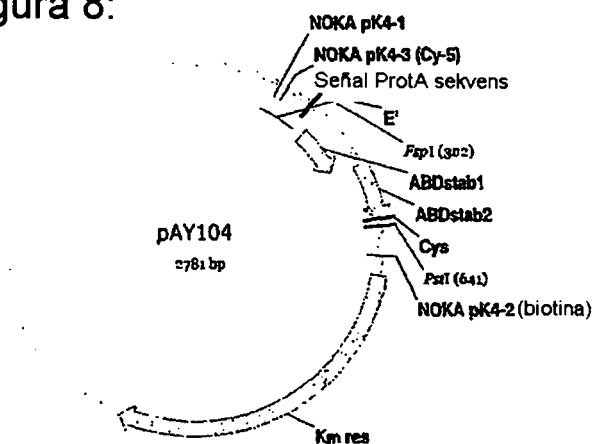


Figura 9:

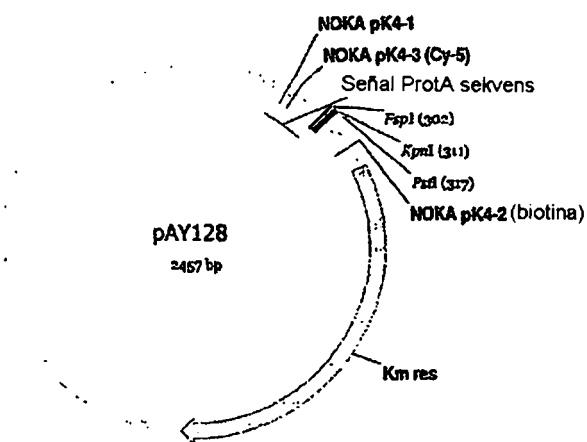


Figura 10:

```

                KpnI
                -----
            FspI           PstI
            -----
    ..GCAAATGCTG CGCRGGGTAC CCTGCAGGGG GGGGGGGGAA..
    ..CGTTACGAC GCGTCCCATG GGACGTCCCC CCCCCCCTT..
    
```

Figura 11:

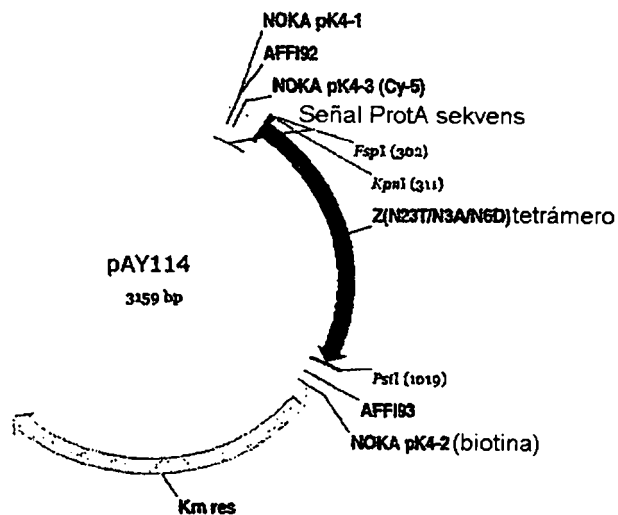


Figura 12:

AFFI-90: PO₃²⁻-GCA ACA CGA TGA AGC CGG TAC CCT GCA
 AFFI-91: GGG TAC CGG CTT CAT CGT GTT GC

```

                KpnI
                -----
            FspI           PstI
            -----
    ..GCAAATGCTG CGCAACACGA TGAAGCCGGT ACCCTGCAGG GGGGGGGGGG..
    ..CGTTACGAC GCGTTGTGCT ACTTGGCCA TGGGACGTCC CCCCCCCCCC..
    
```

Figura 13:

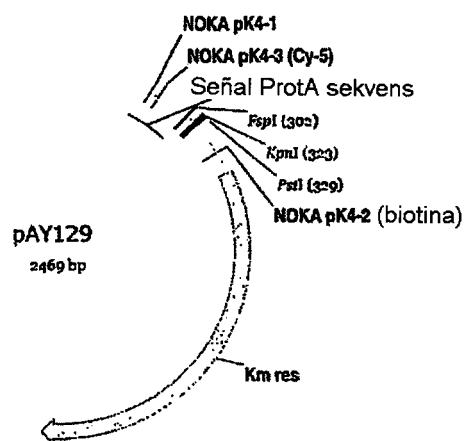


Figura 14:

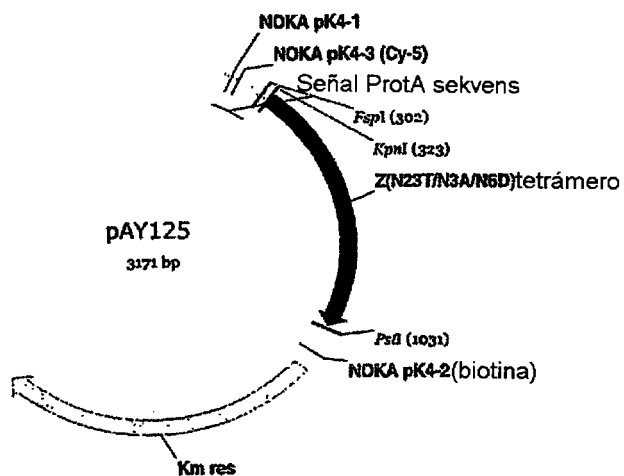


Figura 15:

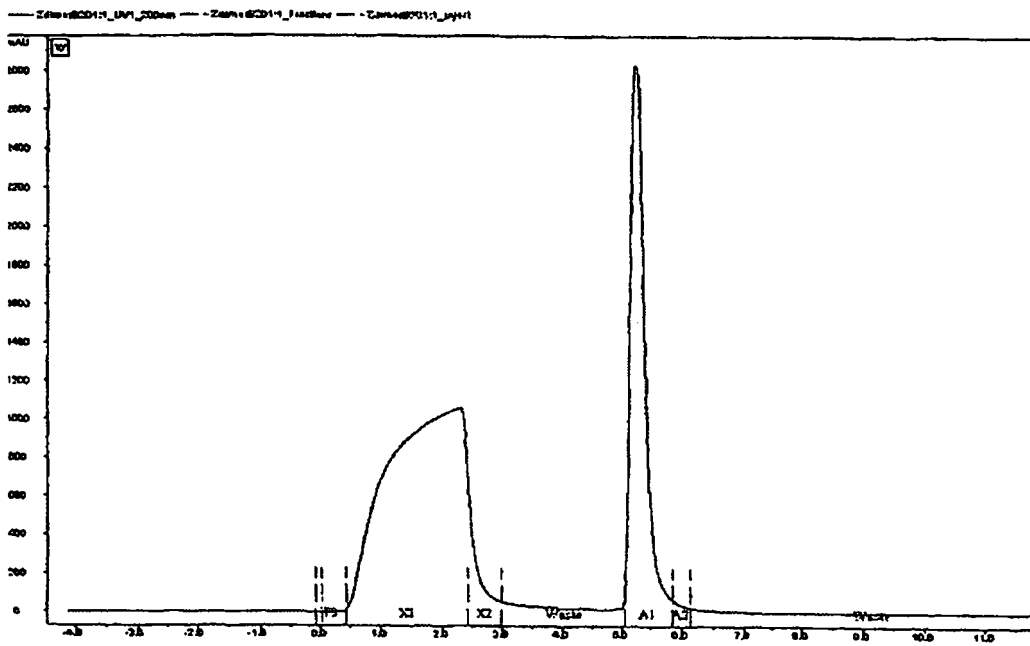
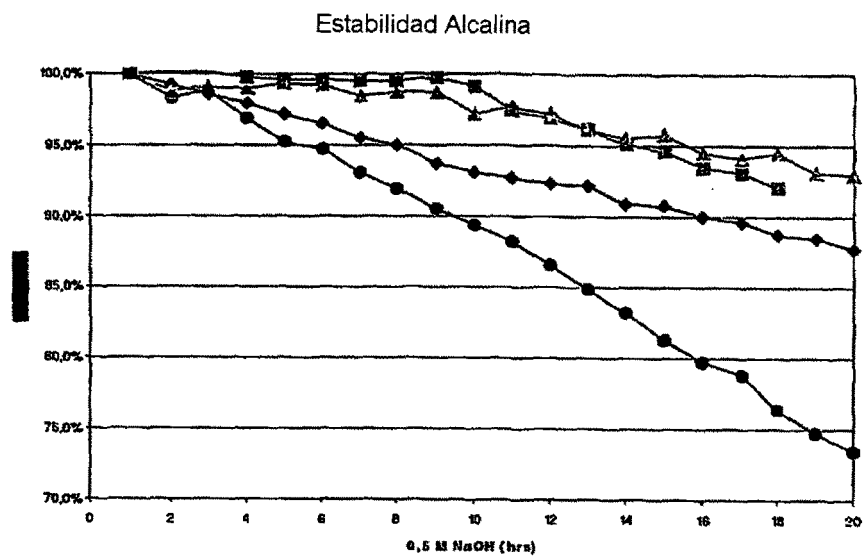


Figura 16:



ES 2 325 362 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Amersham Biosciences

5 <120> PROTEÍNA MUTANTE

<130> PU 0215

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1
<211> 58
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

20 <400> 1

Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15	
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala
		35					40					45			
Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys						
	50					55									

40 <210> 2
<211> 58
<212> PRT
<213> *Staphylococcus aureus*

45 <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (29) .. (29)
<223>

50 <400> 2

Val	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15	
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala
		35					40					45			
Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys						
	50					55									

65

ES 2 325 362 T3

<210> 3
<211> 58
<212> PRT
5 <213> *Staphylococcus aureus*

<220>
10 <221> MUTÁGENO
<222> (29) .. (29)
<223>

15 <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (30)..(30)
<223>
20

<400> 3

25 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

30 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Ala Ile Gln
20 25 30

35 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

40 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

40 <210> 4
<211> 58
<212> PRT
45 <213> *Staphylococcus aureus*

<220>
50 <221> MUTÁGENO
<222> (23) .. (23)
<223>

55 <220>
<221> MUTÁGENO
<222> (29) .. (29)
<223>
60

65

ES 2 325 362 T3

<400> 4

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
5
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
10
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
15
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65