

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 359**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

B01J 20/286 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009** **E 09180615 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 2202310**

54 Título: **Ligandos de cromatografía estables en medio cáustico**

30 Prioridad:

24.12.2008 US 203664 P

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

06.06.2013

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 CONCORD ROAD
BILLERICA MASSACHUSETTS 01821, US

72 Inventor/es:

BIAN, NANYING;
SOICE, NEIL;
SPECTOR, SHARI y
LEVINE, KARA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 406 359 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

Ligandos de cromatografía estables en medio cáustico

Campo de la invención

La presente invención se refiere a ligandos de cromatografía que tienen estabilidad cáustica mejorada, *por ejemplo*, ligandos basados en proteínas de unión a inmunoglobulina tales como, proteína A *Estafilocócica*, así como a matrices de cromatografía que comprenden dichos ligandos.

Antecedentes

Los ligandos utilizados en cromatografía de afinidad normalmente confieren una alta selectividad por la molécula diana, dando por lo tanto como resultando una purificación económica, rápida y a alto rendimiento de las moléculas diana. Los reactivos y las matrices de cromatografía basados en proteína A estafilocócica (SpA) han encontrado un amplio uso en el campo de la cromatografía de afinidad para la captura y purificación de anticuerpos así como en los procedimientos de detección de anticuerpos debido a su capacidad para unirse a IgG sin afectar significativamente a la afinidad de la inmunoglobulina por el antígeno.

Por consiguiente, se han desarrollado diversos reactivos y medios que comprenden ligandos basados en proteína A y que se encuentran disponibles en el comercio, que incluyen, *por ejemplo*, ProSep®-vA High Capacity, ProSep® vA Ultra y ProSep® UltraPlus (Millipore) y Proteína A Sepharose™, MabSelect™, MabSelect Xtra™ y MabSelect SuRe® (GE Healthcare) y Poros Mab-Capture A™ (Applied Biosystems).

Para conservar la selectividad y la capacidad de unión de los ligandos de cromatografía incluyendo, *por ejemplo*, resinas que incluyen ligandos de cromatografía basados en SpA, las resinas unidas al ligando, denominadas matrices de cromatografía, deben de limpiarse y normalmente se limpian en condiciones alcalinas, *por ejemplo*, sin hidróxido de sodio. *Por ejemplo*, un procedimiento convencional que se usa para la limpieza y renovación de la matriz es un protocolo alcalino de limpieza en el sitio (CIP, por las siglas *Cleaning-In-Place*), que normalmente implica el tratamiento de la matriz con NaOH 1 M, pH 14. Sin embargo, frecuentemente dicho tratamiento riguroso no es deseable, especialmente, cuando el ligando es una proteína o una molécula basada en proteínas.

El documento US 2006/0134805 A1 desvela la purificación de inmunoglobulinas. El documento WO 03/080655 A1 desvela una proteína de unión a inmunoglobulina mutada. El documento EP 0550771 A1 desvela la proteína artificial que se combina con inmunoglobulina. El documento EP 0230869 A desvela la construcción de una proteína de unión a IgG para facilitar el procesamiento aguas abajo usando modificación de proteínas por ingeniería genética. El documento JP 2006304633 A desvela una proteína de unión a inmunoglobulina. El documento Eur. J. Biochem. 186,557-561 (1989) desvela la inmovilización dirigida por tiol de receptores de unión a IgG recombinante. En Amersham Application Note 2004, "Process-scale antibody purification" 2004, Amersham Biosciences, páginas 1 a 6 se desvelan estudios sobre "MabSelect SuRe sobre toxicidad, filtración, eliminación y saneamiento de ligandos.

El documento Protein Engineering, vol. 1, no. 2, páginas 107 a 113, 1987 desvela un dominio de unión a IgG sintético basado en la proteína A estafilocócica. El documento A. J. Chromatography B, 848 (2007) 40-47 desvela una cromatografía con la proteína A para la purificación de anticuerpos. El documento FEMS Immunology and Medical Microbiology 20 (1998) 69-78 desvela que todos los dominios individuales de la proteína A estafilocócica muestran unión a Fab. El documento WO 00/69457 A desvela dominios de unión basados en proteína A con actividades deseables. El documento WO 2008/039141 A desvela un ligando de cromatografía que comprende un dominio C de la proteína A de *Staphylococcus aureus* para el aislamiento de anticuerpos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona ligandos de cromatografía basados en SpA estables en medio alcalino que pueden, *por ejemplo*, resistir ciclos repetidos de limpieza en el sitio (CIP). Más específicamente, los ligandos de acuerdo con la invención pueden soportar la limpieza en medio alcalino convencional durante un periodo de tiempo prolongado, lo que hace que los ligandos sean candidatos atractivos, especialmente para la purificación de inmunoglobulinas a gran escala y rentable.

En un aspecto de la presente invención, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino comprende dos o más dominios de SpA. *Por ejemplo*, en algunas realizaciones de acuerdo con este aspecto, se proporciona un ligando de cromatografía estable en medio alcalino que comprende dos o más dominios B o dos o más dominios Z de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA), o un fragmento funcional o una variante del mismo, en el que los dos o más dominios B o los dos o más dominios Z están unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina.

En algunas realizaciones de acuerdo con este aspecto, el ligando comprende tres o más dominios B o tres o más dominios Z de SpA, o un fragmento funcional o una variante del mismo, en el que los tres o más dominios B o los tres o más dominios Z están unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina. En algunas otras realizaciones, el ligando comprende cuatro o más dominios B o cuatro o más dominios Z de SpA, en el que los

cuatro o más dominios B o los cuatro o más dominios Z están unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina. En otras realizaciones más, el ligando comprende cinco o más dominios B o cinco o más dominios Z de SpA; o seis o más dominios B o seis o más dominios Z de SpA; o siete o más dominios B o siete o más dominios Z de SpA, en el que los cinco o más dominios B o los cinco o más dominios Z, o los seis o más dominios B, o los seis o más dominios Z, o los siete o más dominios B o los siete o más dominios Z están unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina.

En otro aspecto de acuerdo con la presente invención, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino comprende uno o más dominios aislados E, D, A, B, C o Z de la proteína A de *Staphylococcus*, en el que el uno o más dominios aislados comprenden uno o más restos de aminoácidos mutados en la posición n+1 por cualquier aminoácido de origen natural excepto cisteína (C), serina (S), alanina (A), glicina (G), asparagina (N) o glutamina (Q). En algunas realizaciones, n representa el resto de asparagina en la posición 23 de un dominio de SpA aislado. En la Tabla I se muestran ligandos ejemplares que tienen una mutación en la posición 24 de un dominio de SpA aislado en el que n representa una asparagina.

Tabla I

Dominios SpA que incluyen modificaciones	Denominación
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por metionina	E-D24M D-E24M A-E24M B-E24M C-E24M Z-E24M
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por isoleucina	E-D24I D-E24I A-E24I B-E24I C-E24I Z-E24I
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por fenilalanina	E-D24F D-E24F A-E24F B-E24F C-E24F Z-E24F
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por treonina	E-D24T D-E24T A-E24T B-E24T C-E24T Z-E24T
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por prolina	E-D24P D-E24P A-E24P B-E24P C-E24P Z-E24P
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por triptófano	E-D24W D-E24W A-E24W B-E24W C-E24W Z-E24W

Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por arginina	E-D24R D-E24R A-E24R B -E24R C-E24R Z-E24R
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por valina	E-D24V D-E24V A-E24V B-E24V C-E24V Z-E24V
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por leucina	E-D24L D-E24L A-E24L B-E24L C-E24L Z-E24L
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por tirosina	E-D24Y D-E24Y A-E24Y B-E24Y C-E24Y Z-E24Y
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por histidina	E-D24H D-E24H A-E24H B-E24H C-E24H Z-E24H
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por lisina	E-D24K D-E24K A-E24K B-E24K C-E24K Z-E24K
Dominio E, D, A, B, C o Z-ácido glutámico en la posición 24 o ácido aspártico en la posición 24 sustituidos por ácido glutámico	D-E24D A-E24D B-E24D C-E24D Z-E24D

En la Tabla II se representan los códigos de una sola letra de los aminoácidos de origen natural así como los correspondientes codones de tres letras que codifican cada aminoácido. En general, debido a la degeneración de codones, más de un codón de tres letras puede codificar al mismo aminoácido.

Tabla II

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC “ TTA Leu (L) TTG “	TCT Ser (S) TCC “ TCA “ TCG “	TAT Tyr (Y) TAC TAA Terminación TAG Terminación	TGT Cys (C) TGC TGA Terminación TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC “ CTA “ CTG “	CCT Pro (P) CCC “ CCA “ CCG “	CAT His (H) CAC “ CAA Gln (Q) CAG “	CGT Arg (R) CGC “ CGA “ CGG “
A	ATT Ile (I) ATC “ ATA “ ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC “ ACA “ ACG “	TAT Asn (N) AAC “ AAA Lys (K) AAG “	AGT Ser (S) AGC “ AGA Arg (R) AGG “
G	GTT Val (V) GTC “ GTA “ GTG “	GCT Ala (A) GCC “ GCA “ GCG “	GAT Asp (D) GAC “ GAA Glu (E) GAG “	GGT Gly (G) GGC “ GGA “ GGG “

La presente invención también incluye una matriz de cromatografía que comprende un ligando de acuerdo con uno o más aspectos de la invención acoplado a un soporte sólido tal como, *por ejemplo*, al menos un vehículo insoluble.

Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan procedimientos de uso de los ligandos descritos en el presente documento. Por consiguiente, se proporciona un procedimiento de purificación por afinidad de una o más moléculas diana (*por ejemplo*, inmunoglobulinas) a partir de una muestra, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una muestra que comprenda una o más moléculas diana (*por ejemplo*, inmunoglobulinas);
- (b) poner en contacto la muestra con una matriz de acuerdo con la invención en condiciones tales que una o más moléculas diana (*por ejemplo*, inmunoglobulinas) se unan a la matriz y
- (c) recuperar la una o más moléculas diana unidas (*por ejemplo* inmunoglobulinas) mediante elución en condiciones adecuadas, tales como, *por ejemplo*, un pH adecuado.

En algunas realizaciones, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino de acuerdo con la presente invención conserva al menos un 95 % de su capacidad de unión después de 5 horas, o después de 10 horas, después de 15 horas, o después de 20 horas o después de 25 horas, o después de 30 horas de incubación en NaOH 0m5 M.

Las inmunoglobulinas que pueden unirse mediante los diversos ligandos descritos en el presente documento, incluyen, *por ejemplo*, IgG, IgA e IgM o cualquier proteína de fusión que comprenda un anticuerpo y cualquier fragmento de anticuerpo.

En el presente documento también se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los diversos ligandos descritos en el presente documento, así como células huésped que incluyen dichas moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones, una célula huésped es una célula procariota. En otras realizaciones, una célula huésped es una célula eucariota.

Adicionalmente, la presente invención incluye una biblioteca de polipéptidos que comprende uno o más ligandos descritos en el presente documento, y fragmentos funcionales y variantes de los mismos. En otra realización más, la presente invención proporciona una biblioteca de moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más ligandos incluidos en la presente invención o que codifican fragmentos funcionales y variantes de los mismos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona ligandos basados en SpA que presentan unión alterada (aumentada o disminuida) a una parte Fab de una inmunoglobulina en comparación con los ligandos basados en SpA previamente conocidos, conservando al mismo tiempo la capacidad de unirse a la parte Fc de la inmunoglobulina. En una realización, un ligando basado en SpA de acuerdo con la presente invención presenta una unión disminuida a una parte Fab de una inmunoglobulina en comparación con una SpA natural. En una realización

ejemplar, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino de acuerdo con la presente invención incluye adicionalmente el aminoácido glicina en la posición 29 sustituido por una alanina. En otra realización, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino de acuerdo con la presente invención incluye adicionalmente la glicina en la posición 29 sustituida por un aminoácido distinto de alanina o triptófano.

5 **Breve descripción de las figuras**

La FIGURA 1 representa las secuencias de ácido nucleico de los dominios de unión a IgG naturales (*wt*, *wild type*) de SpA, representadas por las SEC ID Nos: 1-5. La SEC ID N°: 1 representa la secuencia de ácido nucleico del dominio E natural; la SEC ID N°: 2 representa la secuencia de ácido nucleico del dominio D natural; la SEC ID N°: 3 representa la secuencia de ácido nucleico del dominio A natural; la SEC ID N°: 4 representa la secuencia de ácido nucleico del dominio B natural; y la SEC ID N°: 5 representa la secuencia de ácido nucleico del dominio C natural.

La FIGURA 2 representa la secuencia de ácido nucleico del dominio Z de SpA, representada por la SEC ID N°: 6.

La FIGURA 3 representa los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios de unión a IgG naturales de SpA (E, D, A, B y C). La SEC ID N°: 7 representa la secuencia de aminoácidos del dominio E natural; la SEC ID N°: 8 representa la secuencia de aminoácidos del dominio D natural; la SEC ID N°: 9 representa la secuencia de aminoácidos del dominio A natural; la SEC ID N°: 10 representa la secuencia de aminoácidos del dominio B natural; y la SEC ID N°: 11 representa la secuencia de aminoácidos del dominio C natural.

La FIGURA 4 representa la secuencia de aminoácidos del dominio Z, representada por la SEC ID N°: 12.

La FIGURA 5 representa un esquema del plásmido pJ56:8620.

La FIGURA 6 representa las secuencias de aminoácidos del dominio B natural de SpA marcado con his así como los diversos mutantes n+1 marcados con his. La SEC ID N°: 13 representa la secuencia de aminoácidos del dominio B natural de SpA marcado con his y las SEC ID Nos: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 representan las secuencias de aminoácidos de los mutantes n+1 del dominio B, E24M, E24I, E24F, E24T, E24P, E24W, E24R, E24V, E24L, E24Y, E24H, E24K y E24D, respectivamente.

La FIGURA 7 representa las secuencias de ácido nucleico del dominio B natural de SpA marcado con his así como las secuencias de ácido nucleico que codifican los diversos mutantes n+1 marcados con his. La SEC ID N°: 27 representa la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio B natural de SpA marcado con his y las SEC ID Nos: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 representan las secuencias de ácido nucleico que codifican los mutantes n+1 del dominio B, E24M, E24I, E24F, E24T, E24P, E24W, E24R, E24V, E24L, E24Y, E24H, E24K y E24D, respectivamente.

La FIGURA 8 representa un gráfico de barras que resume los resultados de un experimento ejemplar que ensaya la unión a IgG residual en los diversos mutantes n+1 del dominio B marcados con his, en el que n representa la asparagina en la posición 23, usando el ensayo de alto rendimiento basado en ELISA descrito en el presente documento. El eje X representa los diversos mutantes n+1 del dominio B que tienen una mutación en la posición 24 y el eje Y representa el porcentaje de unión a IgG restante después de una exposición de seis horas a NaOH 1 M. Como se muestra en el gráfico, los mutantes n+1 del dominio B que tienen aminoácidos que contienen cadenas laterales voluminosas en la posición 24 presentan una estabilidad cáustica aumentada con respecto al dominio B natural.

La FIGURA 9 representa los resultados de un experimento ejemplar que ensaya el porcentaje de capacidad de unión a IgG conservado de los diversos trímeros de los dominios de SpA (*es decir*, EEE, DDD, AAA, BBB, CCC y ZZZ) después de su unión multipunto a una resina de agarosa. nPrA se refiere a la SpA natural. El eje X representa el número de ciclos de exposición cáustica, en el que cada ciclo consiste en una exposición de 15 minutos a NaOH 0,5 M. El eje Y representa la capacidad de unión a IgG conservada de los ligandos de SpA unidos. Como se muestra en el gráfico de la FIGURA 9, los ligandos que incluyen los trímeros del dominio C o Z son generalmente equivalentes en cuanto a su estabilidad cáustica y son más estables en medio cáustico que los ligandos que incluyen trímeros del dominio B, que son más estables en medio cáustico que los ligandos que incluyen los trímeros del dominio A, que son más estables en medio cáustico que los ligandos que incluyen trímeros de los dominios E o D.

La FIGURA 10 representa los resultados de un experimento ejemplar que ensaya el porcentaje de capacidad de unión a IgG conservado de los ligandos unidos, de acuerdo con la presente invención, que contienen tres (B3) o cuatro (B4) o cinco (B5) dominios B, unidos mediante unión multipunto a una resina de agarosa. Además, para reducir la unión a Fab (G29A), se usan ligandos unidos que contienen cinco dominios B o siete dominios B y que adicionalmente incluyen una mutación, denominados B5-NF y B7-NF, respectivamente. nPrA se refiere a la SpA natural. El eje X representa el número de ciclos de exposición cáustica, en el que cada ciclo consiste en una exposición de 15 minutos a NaOH 0,5 N. El eje Y representa la capacidad de unión a IgG conservada de los ligandos de SpA unidos. Como se muestra en el gráfico de la FIGURA 10, el nivel o grado de estabilidad cáustica es directamente proporcional al número de dominios B en los ligandos y no está alterado por la mutación G29A para disminuir la unión a Fab.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona ligandos de cromatografía estables en medio alcalino basados en SpA y en particular ligandos basados en uno o más dominios de SpA. Los ligandos de cromatografía estables en medio alcalino basados en SpA descritos anteriormente incluyen, por ejemplo, los descritos en la solicitud de patente Internacional PCT nº WO2008/039141, que trata sobre ligandos de cromatografía estables en medio alcalino basados en el dominio C de SpA que pueden unirse a las partes Fab de los anticuerpos y que están acoplados a un vehículo insoluble en un solo sitio usando un grupo de acoplamiento terminal; y los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 6.831.161, que trata sobre ligandos de cromatografía estables en medio alcalino basados en SpA en el que se ha modificado un resto, o más de un resto, de aminoácido de asparagina.

Para que la presente divulgación pueda entenderse mejor, primero se definen determinados términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen otras definiciones.

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, la expresión "SpA" o "proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refiere a una proteína multi-dominio de 42 kDa aislada de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La proteína SpA está unida a la pared celular bacteriana mediante su región de unión a la pared celular carboxi-terminal, denominada dominio X. En la región amino-terminal, esta incluye cinco dominios de unión a inmunoglobulina, denominados E, D, A, B y C (Sjodhal, Eur J Biochem. Sep 78(2): 471-90 (1977); Uhlen y col., J Biol Chem. Feb 259(3): 1695-702 (1984). Cada uno de estos dominios contiene aproximadamente 58 restos de aminoácidos y comparten una identidad de secuencia de aminoácidos de 65-90 %. El dominio Z de la SpA es un análogo modificado por ingeniería genética del dominio B de la SpA e incluye un resto de alanina en lugar de un resto de glicina en la posición 29 (Nilsson, y col., Protein engineering, Vol. 1, No. 2, 107-113, 1987). Cada uno de los dominios E, D, A, B y C de la SpA posee distintos sitios de unión a Ig. Un sitio es para Fcγ (la región constante de la clase IgG o de Ig) y el otro es para la parte Fab de determinadas moléculas de Ig (la parte de la Ig que es responsable del reconocimiento del antígeno). Se ha descrito que cada uno de los dominios contiene un sitio de unión a Fab. La parte de unión no-Ig de la SpA se localiza en el extremo C y se denomina región X o dominio X.

En la Patente de Estados Unidos Nº 5.151.350 se describe la clonación del gen que codifica a la SpA.

La presente invención proporciona ligandos de cromatografía estables en medio alcalino basados en SpA. En algunos aspectos de acuerdo con la presente invención, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino comprende dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o seis o más, o siete o más dominios B o Z naturales aislados de SpA. En otros aspectos de acuerdo con la presente invención, un ligando de cromatografía estable medio alcalino comprende uno o más dominios E, D, A, B, C o Z de SpA, en el que el uno o más dominios aislados comprenden uno o más restos de aminoácidos en la posición mutada n+1 de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano, arginina, treonina, isoleucina, valina y metionina, en el que n representa una asparagina.

En una realización particular, la presente invención proporciona un ligando de cromatografía que comprende dos o más dominios B de SpA, unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina. En otra realización, la presente invención proporciona un ligando de cromatografía que comprende dos o más dominios Z de SpA, unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina. En otra realización más, un ligando de cromatografía comprende dos o más dominios C de SpA, unidos a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina.

La presente invención también incluye variantes de aminoácidos de SpA, que pueden diferenciarse de la secuencia de aminoácidos parental de la cual derivan, en la sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos en cualquier lugar dentro de la secuencia de aminoácidos parental y son estables en medio alcalino. En algunas realizaciones, las variantes de la secuencia de aminoácidos poseerá una identidad de al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 85 %, o al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 96 %, o al menos aproximadamente 97 %, o al menos aproximadamente 98 % con la secuencia parental (es decir, los dominios SpA o dominio Z naturales), en el que dichas variantes son estables en medio alcalino. En una realización particular, las variantes de SpA incluyen adicionalmente el resto de aminoácido glicina en la posición 29 sustituido por un resto de aminoácido distinto de alanina o triptófano, conservando al mismo tiempo su estabilidad alcalina.

En el presente documento, la expresión "variante funcional" de una proteína significa una variante de una proteína, en el que la función, en relación con la invención, definida como estabilidad alcalina, se conserva esencialmente. Las variantes funcionales incluyen, sin limitación, variantes de SpA que incluyen más que dominios de SpA, por ejemplo, dímeros, trímeros, multímeros de diversos dominios de SpA y variantes de SpA que tienen una delección, sustitución y/o adición de uno o más aminoácidos en uno o más dominios naturales de SpA, conservando al mismo tiempo la estabilidad alcalina, como se define en el presente documento.

En el presente documento, la expresión "molécula parental" se usa para la correspondiente proteína en la forma antes de modificarse de acuerdo con la invención o en la que se ha introducido una mutación de acuerdo con la

invención.

La expresión "identidad de secuencia" significa que, cuando dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos están alineadas óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 70 %, o al menos una identidad de secuencia del 80 %, o al menos una identidad de secuencia del 85 %, o al menos una identidad de secuencia del 90 %, o al menos una identidad de secuencia del 95 % o más. Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia (*por ejemplo*, secuencia parental) con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de referencia y de ensayo en un ordenador, posteriormente se diseñan las coordenadas, y si fuera necesario, se diseñan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Después, basándose en los parámetros del programa diseñados, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia (o secuencias) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, *por ejemplo*, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda por el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, PASTA y TFASTA en el paquete de Programas Informáticos de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase en líneas generales Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990). El programa informático para realizar análisis BLAST se encuentra disponible al público en el National Center for Biotechnology Information (accesible al público a través del servidor de Internet de National Institutes of Health NCBI). Normalmente, para realizar la comparación de secuencias, pueden usarse parámetros del programa por defecto, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza, por defecto, una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Prec. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Como se usa indistintamente en el presente documento, las expresiones "domino E", "domino E de SpA", y "dominio E de la proteína A de *Staphylococcus*" se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEC ID N°: 7 o que está codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1. El "domino E" es un polipéptido de 51 aminoácidos que se pliega en una estructura en haz de tres hélices. Este dominio puede unirse a Fc mediante restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab mediante restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio E de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, o de al menos 80 %, o de al menos 90 %, o de al menos 95 % o más, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 7.

Como se usa indistintamente en el presente documento, las expresiones "domino D", "domino D de SpA", y "dominio D de la proteína A de *Staphylococcus*", se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEC ID N°: 8 o que está codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 2. El "domino D" es un polipéptido de 61 aminoácidos que se pliega en una estructura en haz de tres hélices. Este dominio puede unirse a Fc mediante restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab mediante restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio D de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, o de al menos 80 %, o de al menos 90 %, o de al menos 95 % o más, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 8.

Como se usa indistintamente en el presente documento, las expresiones "domino A", "domino A de SpA", y "dominio A de la proteína A de *Staphylococcus*", se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEC ID N°: 3 o que está codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 9. El "domino A" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura en haz de tres hélices. Puede unirse a Fc mediante restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab mediante restos en la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio A de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, o de al menos 80 %, o de al menos 90 %, o de al menos 95 % o más, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 3.

Como se usa indistintamente en el presente documento, las expresiones "domino B", "domino B de SpA", y "dominio B de la proteína A de *Staphylococcus*", se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEC ID N°: 10 o que está codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 4. El "domino B" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura en haz de tres hélices. Puede unirse a Fc mediante restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab mediante restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio B de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, o de al menos 80 %, o de al menos 90 %, o de al menos 95 % o más, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 10.

Como se usa indistintamente en el presente documento, las expresiones "domino C", "domino C de SpA", y "dominio

C de la proteína A de *Staphylococcus*", se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEC ID N°: 11 o que está codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 5. El "domino C" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura en haz de tres hélices. Puede unirse a Fc mediante los restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab mediante restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio C de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, o de al menos 80 %, o de al menos 90 %, o de al menos 95 % o más, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 11.

Como se usa indistintamente en el presente documento, las expresiones "domino Z", "domino Z de SpA", y "dominio Z de la proteína A", se refiere al polipéptido de 59 aminoácidos, con tres hélices, que es una variante del domino B de la proteína A. La secuencia de aminoácidos del dominio Z se expone en la SEC ID N°: 12. Un dominio Z ejemplar se describe en Nilsson y col., Protein Engng., 1: 107-113 (1997).

Las expresiones "estable en medio alcalino", "estabilidad alcalina", "estable en medio cáustico" o "estabilidad cáustica", como se usan en el presente documento, se refieren generalmente a la capacidad de un ligando de cromatografía, de acuerdo con la presente invención, solo o cuando se moviliza sobre una resina de cromatografía, para soportar ciclos repetidos de limpieza en el sitio (CIP) usando lavado alcalino sin perder su capacidad de unión. En general, se supone que una resina, por sí misma, sobre la cual se moviliza un ligando de acuerdo con la invención, contribuye a un cambio en la estabilidad menor de un 5 % después de haberse sumergido en NaOH 0,5 M durante hasta 30 horas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ligandos de cromatografía de acuerdo con la invención pueden soportar una limpieza alcalina convencional durante un periodo de tiempo prolongado, lo que hace que los ligandos sean candidatos atractivos, especialmente para la purificación rentable, a gran escala, de inmunoglobulinas. En algunas realizaciones, un ligando de acuerdo con la presente invención presenta una estabilidad química mejorada en un medio alcalino, que puede definirse, por ejemplo, por tener un valor de pH aumentado tal como por encima de aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 13 o 14. Como alternativa, el medio alcalino puede definirse por la concentración de una base, *por ejemplo*, NaOH a una concentración de aproximadamente 1,0 M, o NaOH a una concentración de aproximadamente 0,7 M, o NaOH a una concentración de aproximadamente 0,5 M. En una realización, estabilidad alcalina se refiere a la capacidad de un ligando de cromatografía estable en medio alcalino de acuerdo con la invención de conservar al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 % de su capacidad de unión después de 5 horas, o después de 10 horas, o después de 15 horas, o después de 20 horas, o después de 25 horas, o después de 30 horas de incubación en NaOH a una concentración 0,5 M. En otra realización, estabilidad alcalina se refiere a una disminución en la capacidad de unión del ligando menor del 70 %, o menor del 60 %, o menor del 50 %, o menor del 30 % incluso después del tratamiento con NaOH a una concentración 0,5 M durante 5 horas o 7,5 horas o 10 horas o 15 horas o 20 horas o 25 horas o 30 horas.

En algunas realizaciones, los ligandos de cromatografía basados en SpA de acuerdo con la presente invención presentan una estabilidad alcalina aumentada o mejorada en comparación con la SpA natural.

Un experto en la técnica puede medir fácilmente la estabilidad alcalina usando experimentación rutinaria y/o como se describe en el presente documento.

El término "cromatografía", como se usa en el presente documento, se refiere a una técnica de separación dinámica que separa el analito de interés (*por ejemplo*, una inmunoglobulina) de otras moléculas en la mezcla y que permite su aislamiento. Normalmente, en un procedimiento de cromatografía, una fase móvil (líquida o gaseosa) transporta una muestra que contiene el analito de interés a través o a lo largo de un medio (normalmente sólido) en fase estacionaria. Las diferencias en la partición o afinidad en la fase estacionaria separan diferentes analitos mientras que la fase móvil lleva al exterior los diferentes analitos a tiempos diferentes.

La expresión "cromatografía de afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a un modo de cromatografía en el que el analito a separar se aísla mediante su interacción con una molécula (*por ejemplo*, un ligando de cromatografía estable en medio alcalino) que interacciona específicamente con el analito. En una realización, la cromatografía de afinidad implica la adición de una muestra que contiene un analito diana (*por ejemplo*, una inmunoglobulina) a un soporte sólido que transporta sobre el mismo un ligando de cromatografía estable en medio alcalino como se describe en el presente documento.

La expresión "cromatografía de afinidad basada en proteína A", como se usa en el presente documento se refiere a la separación o aislamiento de sustancias usando ligandos de SpA o proteína A, tales como los descritos en el presente documento, en el que los ligandos de SpA o proteína A se inmovilizan, *por ejemplo*, sobre un soporte sólido. Los ejemplos de medios/resinas de cromatografía de afinidad basados en proteína A conocidos en la técnica incluyen los que tienen la proteína A inmovilizada sobre una estructura de vidrio de poros controlados, *por ejemplo*, medios/resinas PROSEP A™ y PROSE vA™ (Millipore); los que tienen la proteína A inmovilizada sobre una fase sólida de poliestireno, *por ejemplo*, medios/resinas POROS 50A™ y Poros MabCapture A™ (Applied Biosystems, Inc.); y los que tienen la proteína A inmovilizada sobre un soporte sólido de agarosa, *por ejemplo*, columnas de rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o MABSELECT™ (Amersham Biosciences).

Los términos "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usados indistintamente en el presente documento) se refieren a

una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que constan de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estabilizándose dichas cadenas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que puede unirse específicamente al antígeno. La expresión "inmunoglobulina monocatenaria" o "anticuerpo monocatenario" (usada indistintamente en el presente documento) se refiere a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas polipeptídicas que constan de una cadena pesada y una cadena ligera, estabilizándose dichas cadenas, por ejemplo, mediante engarces peptídicos intercatenarios, que puede unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (*por ejemplo*, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por láminas β plegadas y/o enlaces disulfuro intracatenarios. Adicionalmente, en el presente documento, a los dominios se les denomina "constantes" o "variables", basándose en la ausencia relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de los diversos miembros de las clases en el caso de un dominio "constante", o en la variación significativa dentro de los dominios de los diversos miembros de clases en el caso de un dominio "variable". A los "dominios" de anticuerpos o polipéptidos se les denomina frecuentemente de manera indistinta en la técnica "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de un anticuerpo se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de un anticuerpo se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de un anticuerpo se denominan indistintamente "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de un anticuerpo se denominan indistintamente "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácidos que un anticuerpo completo o intacto o cadena de anticuerpo. Los fragmentos pueden obtenerse mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto o completo o cadena de anticuerpo. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Los fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una parte polipeptídica de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno o compete con el anticuerpo intacto (*es decir*, con el anticuerpo intacto del que deriva) por la unión al antígeno (*es decir*, unión específica). Los fragmentos de unión pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, cadenas sencillas y anticuerpos monocatenarios.

También se incluyen proteínas de fusión que incluyen un anticuerpo o un fragmento del mismo como una parte de la proteína de fusión.

Las expresiones "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico", se usan indistintamente en el presente documento, para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Estas expresiones incluyen un ADN monocatenario, bicatenario o tricatenario, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos derivatizadas o no naturales, modificadas química o bioquímicamente. La estructura básica del polinucleótido puede comprender grupos glucídicos y fosfato (como puede encontrarse normalmente en el ARN o ADN) o grupos glucídicos o fosfato modificados o sustituidos. Además, puede obtenerse un polinucleótido bicatenario a partir del polinucleótido monocatenario producto de la síntesis química bien sintetizando la cadena complementaria e hibridando las cadenas en condiciones apropiadas, o bien sintetizando la cadena complementaria *de novo* usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado. Una molécula de ácido nucleico puede tener muchas formas diferentes, *por ejemplo*, un gen o fragmento génico, uno o más exones, uno o más intrones, ARNm, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácido nucleico. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos y análogos de nucleótidos metilados, uracilo, otros grupos glucídicos y de unión tales como fluororribosa y tioato y ramificaciones de nucleótidos. Como se usa en el presente documento, "ADN" o "secuencia de nucleótidos" incluye no solo las bases A, T, C y G, sino que también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases, tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleótido tales como engarces sin carga y tioatos, el uso de análogos glucídicos y estructuras básicas modificadas y/o alternativas, tales como poliamidas. En una realización particular, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que decodifica una variante de SpA.

La expresión "unión a Fc", "se une a una parte Fc" o "unión a una parte Fc" se refiere a la capacidad de un ligando de cromatografía estable en medio alcalino descrito en el presente documento, de unirse a la parte cristalizable (Fc) de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el ligando de acuerdo con la presente invención se une a una parte Fc de un anticuerpo (*por ejemplo* IgG1, IgG2 o IgG4 humana) con una afinidad de al menos 10^{-7} M, o al menos 10^{-8} M, o al menos 10^{-9} M.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión a Fab" o "unión a una parte Fab" se refiere a la

capacidad de un ligando de cromatografía estable en medio alcalino descrito en el presente documento, de unirse a una región Fab de un anticuerpo o una molécula de inmunoglobulina. La expresión "unión reducida a una parte Fab" se refiere a cualquier disminución en la unión a una parte Fab (o F(ab)₂) de una molécula de inmunoglobulina por un ligando basado en SpA de la presente invención con respecto a la SpA natural, en el que el ligando incluye adicionalmente una mutación en uno o más aminoácidos. En una realización ejemplar, un ligando de acuerdo con la presente invención incluye adicionalmente el resto de glicina en la posición 29 sustituido por una alanina. En otra realización, un ligando de acuerdo con la presente invención incluye adicionalmente la glicina en la posición 29 sustituida por un resto de aminoácido distinto de alanina o triptófano. En una realización, la unión a una parte Fab de una molécula de inmunoglobulina no puede detectarse usando técnicas convencionales en la materia y las descritas en el presente documento. La unión a una molécula de inmunoglobulina puede detectarse usando técnicas bien conocidas incluyendo las descritas en el presente documento e incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, cromatografía de afinidad y análisis de resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, una proteína de unión a inmunoglobulina incluida en la presente invención se une a una molécula de inmunoglobulina con una afinidad de al menos 10⁻¹⁰M.

II. Generación de moléculas basadas en SpA para su uso como ligandos de cromatografía

Los ligandos de cromatografía basados en SpA incluidos en la presente invención pueden fabricarse usando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, como una etapa inicial, para la generación de ácidos nucleicos que expresen las moléculas ligando de SpA descritas en el presente documento, pueden usarse técnicas convencionales de modificación por ingeniería genética, *por ejemplo*, las descritas en el manual de laboratorio titulado Molecular Cloning de Sambrook, Fritsch y Maniatis.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más dominios de SpA o partes de los mismos pueden clonarse en un vector adecuado para la expresión en una célula huésped apropiada. Los vectores de expresión adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen normalmente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la SpA variante.

Las moléculas de SpA descritas en el presente documento también pueden seleccionarse químicamente a partir de precursores de fragmentos de aminoácidos usando procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos sintéticos con péptidos en fase sólida tales como las estrategias Boc (terc-butiloxi-carbonilo) o Fmoc (9-fluoroenilmetiloxi carbonilo) (véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos N° 6.060.596; 4.879.378; 5.198.531; 5.240.680).

La expresión de moléculas SpA descritas en el presente documento puede realizarse en células huésped eucariotas tales como células de levadura, insecto o mamífero, o en células huésped procariotas, *por ejemplo*, bacterias tales como *E. coli*.

En algunas realizaciones, las moléculas de SpA o fragmentos y variantes de las mismas pueden expresarse sobre la superficie de un bacteriófago de tal manera que cada fago contenga una secuencia de ADN que codifique una molécula de SpA individual presentada sobre la superficie del fago. La afinidad de la molécula de SpA por una inmunoglobulina puede ensayarse fácilmente usando técnicas convencionales en la materia y las descritas en el presente documento, *por ejemplo*, mediante ELISA y Biacore™ 2000 convencional (Biacore AB, Uppsala Suecia). Es deseable que la afinidad de unión de una molécula de SpA de la presente invención con una inmunoglobulina sea al menos comparable con la de la molécula parental. Adicionalmente, es deseable que la estabilidad alcalina de la molécula de SpA esté generalmente sobre-mejorada con respecto a la molécula parental.

III. Ensayo de estabilidad alcalina de las moléculas de SpA

Después de la generación y purificación de una molécula ligando de SpA adecuada, como se describe en el presente documento, la estabilidad alcalina de la molécula puede ensayarse usando técnicas convencionales en la materia y las descritas en el presente documento. Por ejemplo, la estabilidad alcalina de una molécula SpA de acuerdo con la invención puede ensayarse usando tratamiento rutinario con NaOH a una concentración de aproximadamente 0,5 M, *por ejemplo*, como se describe en la parte experimental más adelante.

En algunas realizaciones, las moléculas de SpA estables en medio alcalino presentan una estabilidad alcalina "aumentada" o "mejorada", lo que significa que las moléculas son estables en condiciones alcalinas durante un periodo de tiempo prolongado con respecto a la SpA natural. Anteriormente, se ha descrito que las moléculas de SpA basadas en el dominio C natural de SpA, o que tienen una mutación de uno o más restos de asparagina, proporcionan una estabilidad química mejorada y por lo tanto una menor tasa de degradación en medios en los que el pH está por encima de aproximadamente 10, tal como aproximadamente 13 o 14.

La presente invención se basa en el sorprendente e inesperado descubrimiento de nuevas moléculas de SpA que presentan una estabilidad alcalina aumentada incluso cuando están basadas en dominios distintos del dominio C o que tienen mutaciones en aminoácidos distintos de asparagina. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de SpA y moléculas de SpA estables en medio alcalino basadas en el dominio B o Z que tienen una

mutación en un aminoácido en la posición $n+1$, en la que n representa una asparagina (*por ejemplo*, asparagina en la posición 23).

En algunas realizaciones, después de la generación de los ligandos SpA de acuerdo con la presente invención, la estabilidad alcalina de los ligandos se evalúa usando un nuevo ensayo inmunológico de alto rendimiento, descrito con más detalle en los Ejemplos indicados más adelante. El ensayo se basa en la suposición de que la degradación de SpA, en respuesta a exposición cáustica prolongada, se refleja como una pérdida o reducción en cuanto a la unión de IgG. Resumiendo, los ligandos solubles basados en SpA se tratan durante aproximadamente 6 horas con agua o NaOH 1.0 M. Para unir cantidades de microgramos de ligandos candidatos neutralizados a un soporte sólido en forma de una placa ELISA, *por ejemplo*, una placa de 96 pocillos, se usan interacciones hidrófobas. Después, para cada ligando candidato, la unión de IgG se somete a ensayo, antes y después de la exposición a NaOH 1,0 M. Se indica estabilidad cáustica potenciada cuando la cantidad de unión IgG residual con un ligando después de la exposición cáustica supera la de la SpA natural o SpA parental de la cual deriva.

IV. Soportes usados para la preparación de matrices de cromatografía

En algunas realizaciones, los ligandos SpA estables en medio alcalino incluidos en la presente invención están unidos a un soporte, *por ejemplo*, un soporte sólido o un soporte soluble, para generar una matriz de cromatografía adecuada para la separación de biomoléculas tales como, *por ejemplo*, inmunoglobulinas.

En algunas realizaciones, un ligando de acuerdo con la presente invención está unido a un soporte sólido. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se considera que puede usarse cualquier soporte sólido adecuado para la unión de un ligando de acuerdo con la invención. Por ejemplo, las matrices de soporte sólido incluyen, pero sin limitación, vidrio de poros controlados, sílice, óxido de circonio, agarosa, polimetacrilato, poliácido, poliácridamida y poliestireno.

Se considera que, como soporte sólido, puede usarse cualquier material poroso que contribuya a un cambio menor del 5 % en cuanto a la estabilidad alcalina del ligando unido después de inmersión durante aproximadamente 30 horas en NaOH 0,5 M.

Un material poroso usado como un soporte sólido puede comprender un compuesto hidrófilo, un compuesto hidrófobo, un compuesto oleófilo, un compuesto oleófobo o cualquier combinación de los mismos. El material poroso puede comprender un polímero o un copolímero. Como ejemplos de materiales porosos adecuados se incluyen, pero sin limitación, poli(éter sulfonas), poliamida, *por ejemplo*, nylon, polisacáridos tales como, *por ejemplo*, agarosa y celulosa, poliácido, polimetacrilato, poliácridamida, polimetacrilamida, politetrafluoroetileno, polisulfona, poliéster, fluoruro de polivinilideno, polipropileno, polietileno, policarbonato, un fluorocarbono, *por ejemplo* poli(tetrafluoroetileno-co-perfluoro(alquil vinil éter)), vidrio, sílice, circonio, titanio, cerámica y metal.

El material poroso puede comprender moléculas orgánicas o inorgánicas o una combinación de moléculas orgánicas e inorgánicas y puede comprender uno o más grupos funcionales, *por ejemplo*, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo carbonilo, o un grupo de ácido carboxílico adecuado para relacionar, *por ejemplo*, formando enlaces covalentes para modificación química adicional para unirse covalentemente a una proteína. En otra realización, el material poroso puede no poseer un grupo funcional pero puede revestirse con una capa de material que lleve grupos funcionales tales como, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo aminoácido, un grupo carbonilo o un grupo de ácido carboxílico.

En algunas realizaciones, se usa una matriz de separación por afinidad convencional, *por ejemplo*, de naturaleza orgánica y basada en polímeros que exponen una superficie hidrófila al medio acuoso usado, *es decir*, expone grupos hidroxilo ($-OH$), carboxi ($-COOH$), carbonilo ($-CHO$, o $RCO-R'$), carboxamido ($-CONH_2$, posiblemente en formas sustituidas en N), amino ($-NH_2$, posiblemente en forma sustituida), oligo- o polietilenoxi en sus superficies externas y, si están presentes, también en sus superficies internas. En una realización, los polímeros pueden estar basados, *por ejemplo*, en polisacáridos, tales como dextrano, almidón, celulosa, pululano, agarosa *etc.* que han sido ventajosamente reticulados, *por ejemplo* con bis-epóxidos, epihalohidrinatos, hidrocarburos inferiores 1,2,3 trihalo sustituidos, para proporcionar una porosidad y rigidez adecuadas. En otra realización, el soporte sólido comprende perlas de agarosa porosas. Los diversos soportes usados en la presente invención pueden prepararse fácilmente de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica, tales como, *por ejemplo*, gelatinización de suspensión inversa descritos, *por ejemplo*, en Hjerten, Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964). Como alternativa, las matrices base pueden ser productos disponibles en el mercado, tales como Sepharose™ FastFlow (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). En algunas realizaciones, especialmente ventajosas para separaciones a gran escala, el soporte se adapta para aumentar su rigidez, y por tanto hace que la matriz sea más adecuada para caudales altos.

Como alternativa, el soporte sólido puede basarse en polímeros sintéticos, tales como poli(alcohol vinílico), poli(acrilatos de hidroxialquilo), poli(metacrilatos de hidroxialquilo), poliácridamidas, polimetacrilamidas *etc.* En el caso de polímeros hidrófobos, tales como matrices basadas en bencenos sustituidos con divinilo y monovinilo, la superficie de la matriz a menudo se hidrofaliza para exponer grupos hidrófilos como se los definidos anteriormente a un líquido acuoso circundante. Dichos polímeros pueden producirse fácilmente de acuerdo con procedimientos

convencionales, véase *por ejemplo* Arshady, *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988). Como alternativa, puede usarse un producto disponible en el comercio, tal como Source™ (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y Poros (Applied BioSystems, Foster City, CA).

5 En otras realizaciones más, el soporte sólido comprende un soporte de naturaleza inorgánica, *por ejemplo*, sílice, óxido de circonio *etc.* Con frecuencia, la superficie de las matrices inorgánicas se modifica para incluir grupos reactivos adecuados para reaccionar después con SpA y sus variantes. Los ejemplos incluyen CM Circonia (Ciphergen-BioSeptra (CergyPontoise, Francia) y CPG® (Millipore).

10 En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar basados, *por ejemplo*, en circona o sílice o vidrio de poros controlados que pueden modificarse para contener grupos reactivos y/o sustentar la inmersión cáustica, para acoplarse a ligandos.

Los formatos de soporte sólido ejemplares incluyen, pero sin limitación, una perla, un gel, una membrana, un casete, una columna, una microplaca, un portaobjetos, una placa o un monolito.

15 Con respecto al formato de una matriz, en una realización, este tiene forma de monolito poroso. En una realización alternativa, la matriz tiene forma de perla o partícula que puede ser porosa o no porosa. Las matrices en forma de perla o partícula pueden usarse como un lecho empaquetado o en una forma suspendida. Las formas suspendidas incluyen las conocidas como lechos expandidos y suspensiones puras, en las que las partículas o las perlas se desplazan libremente. En el caso de monolitos, lecho empaquetado y lechos expandidos, el procedimiento de separación normalmente se realiza después de cromatografía convencional con un gradiente de concentración. En caso de suspensión pura, se usará el modo discontinuo. Además, pueden usarse soportes sólidos en formas tales como una superficie, una microplaca, un capilar o un filtro.

La matriz también podría estar en forma de membrana en un cartucho. La membrana estaría en un formato de lámina plana, espiral o fibra hueca.

25 En otra realización, un ligando de acuerdo con la presente invención se une a un soporte soluble, *por ejemplo*, un polímero soluble. Los soportes solubles ejemplares incluyen, pero sin limitación, un biopolímero tal como, *por ejemplo*, una proteína o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, como polímero soluble puede usarse biotina, como se describe, *por ejemplo*, en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 20080108053. *Por ejemplo*, la biotina puede unirse a un ligando, *por ejemplo*, un ligando estable en medio cáustico basado en SpA de acuerdo con la presente invención, que posteriormente pueda usarse para unirse al ligando para aislar una proteína de interés, *por ejemplo*, un anticuerpo o un fragmento del mismo, *por ejemplo*, presente en una mezcla en bruto y la proteína de interés puede aislarse o separarse mediante precipitación del complejo polimérico proteína-ligando-biotina de una manera reversible o irreversible. El polímero también puede ser un polímero soluble sintético, tal como, *por ejemplo*, incluyendo pero sin limitación, un polímero que contenga grupos cargados negativamente (carboxílicos o sulfónicos), grupos cargados positivamente (grupos de amina cuaternaria, amina terciaria, secundaria o primaria), grupos hidrófobos (grupos fenilo o butilo), grupos hidrófilos (grupos hidroxilo o amino) o una combinación de los anteriores.

30 Pueden encontrarse polímeros solubles sintéticos ejemplares en la Publicación PCT Internacional N° WO2008091740 y en la Publicación de Estados Unidos N° US20080255027.

40 Estos polímeros, después de cambios físicos específicos en una o más condiciones, tales como pH, conductividad o temperatura, pueden usarse para purificar la proteína de interés mediante precipitación de una manera reversible o irreversible. Pueden usarse polímeros sintéticos adecuados solos o pueden acoplarse con un ligando estable en medio cáustico de acuerdo con la presente invención y usarse para la captura/purificación de una proteína de interés, tal como, *por ejemplo*, un anticuerpo o un fragmento del mismo, mediante precipitación de una manera reversible o irreversible.

V. Procedimientos para unir un ligando a un soporte

45 Para unir un ligando a un soporte puede usarse cualquier técnica adecuada, *por ejemplo*, un soporte sólido que incluya los bien conocidos en la técnica y descritos en el presente documento. *Por ejemplo*, en algunas realizaciones, el ligando puede unirse a un soporte mediante técnicas de acoplamiento convencionales utilizando, *por ejemplo*, grupos amino y/o carboxi presentes en el ligando. *Por ejemplo*, bis-epóxidos, epiclorohidrina, CNBr, N-hidroxisuccinimida (NHS) *etc.* son reactivos de acoplamiento bien conocidos. En algunas realizaciones, entre el soporte y el ligando se introduce un espaciador, mejorando de este modo la disponibilidad del ligando y facilitando el

50 acoplamiento químico del ligando al soporte. Como alternativa, el ligando puede unirse al soporte mediante unión no covalente, tal como adsorción física o adsorción bioespecífica.

En diversas realizaciones incluidas en la presente invención, el ligando está unido a un soporte sólido tal como, *por ejemplo*, una resina de cromatografía en más de un sitio, dando por lo tanto como resultado una matriz de cromatografía.

55 La unión de un ligando de cromatografía basado en SpA estable en medio alcalino a un soporte sólido puede conseguirse mediante muchas formas conocidas, la mayoría de ellas bien conocidas en la técnica, así como las descritas en el presente documento. Véase, *por ejemplo*, Hermanson y col., *Immobilized Affinity Ligand Techniques*,

Academic Press, páginas 51-136 (1992).

Por ejemplo, a un soporte sólido pueden acoplarse ligandos de proteína mediante grupos activos sobre la superficie del soporte sólido o del ligando de proteína tales como, por ejemplo, un grupo hidroxilo, tiol, epóxido, amino, carbonilo, epóxido o ácido carboxílico. La unión puede conseguirse usando químicas conocidas que incluyen, pero sin limitación, el uso de activación con bromuro de cianógeno (CNBr), éster de N-hidroxil succinimida, epoxi (bis-oxirano) y amidación reductora.

Por ejemplo, en la bibliografía se ha descrito el acoplamiento de proteínas dirigido con tiol. Véase, *por ejemplo*, Ljungquist, y col. Eur. J. Biochem. Vol 186, páginas 558-561 (1989). Previamente esta técnica se ha aplicado para acoplar la SpA a un soporte sólido. Dado que la SpA natural no contiene grupos tiol, la unión se consigue insertando de manera recombinante una cisteína que contiene tiol en el extremo C de la SpA. Véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos Nº 6.399.750. Diversos productos comerciales tal como MabSelect™, MabSelect™ Xtra y MabSelect™ SuRe se producen mediante este mecanismo. Se ha descrito esta cisteína terminal solo reacciona con el grupo epóxido sobre la superficie sólida, dando por tanto como resultado un solo punto de unión de la SpA con el soporte sólido. Véase, *por ejemplo*, Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry, CRC Press, 2006, página 473.

En el caso de la presente invención, en determinadas realizaciones, los ligandos de cromatografía basados en SpA que comprenden dos o más dominios de SpA se unen a un soporte sólido en más de un sitio mediante unión multipunto no discriminativa. En general, en cada dominio, la SpA contiene abundantes grupos amino libres de numerosas lisinas. La unión de un dominio de SpA con más de un sitio sobre un soporte sólido, *por ejemplo*, una resina de cromatografía con grupo epóxido o aldehído puede conseguirse haciendo reaccionar el grupo amino de la lisina sobre la SpA, mediante una apertura de anillo epóxido o aminación reductora, respectivamente. En determinadas realizaciones, la unión multipunto puede conseguirse por reacción de uno o más aminoácidos naturales sobre la SpA que tienen grupos hidroxilo libres, tales como, por ejemplo, serina y tirosina, con un soporte que contenga un grupo epóxido mediante una reacción de apertura de anillo. Como alternativa, la unión multipunto puede conseguirse, por ejemplo, por la reacción de aminoácidos naturales sobre la SpA que tienen grupos de ácido carboxílicos libres, tales como, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico, con un soporte que contenga grupos amino mediante, por ejemplo, *N,N*-carbonildiimidazol. La unión multipunto del ligando al soporte también puede conseguirse mediante una combinación de todos los mecanismos anteriores.

Para conseguir la estabilidad cáustica usando los multímeros de los dominios de B y Z, la presente invención excluye la mutación de una sola cisteína que conduce a la unión en un solo punto.

Los ligandos de cromatografía basados en SpA también pueden unirse a un soporte sólido mediante un mecanismo asociativo. Por ejemplo, un grupo asociativo puede interaccionar con un ligando de interés de manera no covalente mediante interacción iónica, hidrófoba o una combinación de interacciones, uniendo de esta manera el ligando de interés sobre la superficie sólida. Esto facilita el acoplamiento, a una alta eficacia, del ligando con la matriz sólida, como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 20070207500A1, dando por lo tanto como resultado una densidad de ligando mayor que la de sin grupos asociativos. Los grupos asociativos adecuados para su uso en la invención incluyen especies cargadas tales como especies iónicas, y especies no cargadas tales como especies hidrófobas. El grupo asociativo puede modificar el soporte sólido, *por ejemplo*, uniéndose directamente con el soporte sólido de manera covalente. Los ejemplos adecuados de especies iónicas pueden incluir aminas cuaternarias, aminas terciarias, aminas secundarias, aminas primarias, un grupo sulfónico, ácido carboxílico o una combinación de los mismos. Los ejemplos adecuados de especies hidrófobas pueden incluir un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo o cualquier combinación de los mismos. También se contempla que puedan usarse especies de modo mixto. El grupo asociativo también puede interaccionar con el ligando de proteína. Por tanto la interacción entre el grupo asociativo y el ligando de proteína puede comprender una mezcla de interacciones, *por ejemplo*, de especies iónicas e hidrófobas.

El grupo asociativo puede acoplarse covalentemente con el soporte sólido haciendo reaccionar un grupo funcional sobre el soporte sólido con un grupo funcional sobre el grupo asociativo. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos amina, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, imina, aldehído, cetona, alqueno, alquino, azo, nitrilo, epóxido, cianógenos y ácido carboxílico activado. Como un ejemplo, también pueden reaccionar perlas de agarosa que contienen grupos hidroxilo con la funcionalidad epóxido de un grupo asociativo cargado positivamente, tal como cloruro de glicidil trimetilamonio. Un experto en la materia apreciará que puede acoplarse una pluralidad de grupos asociativos con el soporte sólido siempre que se use al menos un grupo asociativo bifuncional. Por tanto, con el soporte sólido pueden acoplarse grupos asociativos en tándem o estos pueden acoplarse de manera individual directamente con el soporte sólido.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona grupos asociativos y/o ligandos de proteína que pueden acoplarse a un soporte sólido mediante un engarce de intervención. El engarce puede comprender al menos un grupo funcional acoplado a un resto engarzador. El resto engarzador puede comprender cualquier molécula capaz de acoplarse con un grupo funcional. Por ejemplo, el resto engarzador puede incluir cualquiera de un grupo alquilo, un alqueno o un alquino. El resto engarzador puede comprender una cadena de carbono que varíe de 1 a 30 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el engarce puede comprender más de 30 átomos de carbono. El resto

engarzador puede comprender al menos un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno y azufre. El resto engarzador puede comprender una cadena ramificada, una cadena no ramificada o una cadena cíclica. El resto engarzador puede estar sustituido por dos o más grupos funcionales.

La elección de las condiciones tampón apropiadas para el acoplamiento de un ligando de proteína con un soporte sólido se encuentra bien dentro de la habilidad del experto en la materia. Los tampones adecuados incluyen cualquier tampón que no contenga amina, tal como, tampones carbonato, bicarbonato, fosfato y acetato. Cuando se usa química asociativa, la concentración salina del tampón dependerá del grupo asociativo usado. Por ejemplo, la concentración salina puede estar en el intervalo de 5 nM – 100 mM. Cuando se usan especies cargadas, la concentración salina puede ser al menos de 5 nM pero menor de 0,1 M, al menos de 5 nM pero menor de 0,01 M, al menos de 5 nM pero menor de 0,001 M. En determinadas realizaciones, la concentración salina puede ser de 0,01 M. Cuando se usa una especie hidrófoba normalmente es deseable una concentración salina elevada. Por tanto la concentración salina puede ser mayor de 0,001 M, mayor de 0,01 M, o mayor de 0,1 M.

En algunas realizaciones, cuando se usa química asociativa, la reacción se realiza a una temperatura que varía de 0 °C a 99 °C. En determinadas realizaciones el procedimiento de reacción se realiza a una temperatura menor de 60 °C, menor de 40 °C, menor de 20 °C o menor de 10 °C. En algunas realizaciones el procedimiento de la invención se realiza a una temperatura de aproximadamente 4 °C. En otras realizaciones, el procedimiento de la invención se realiza a una temperatura de 20 °C.

VI. Procedimientos para ensayar la estabilidad alcalina de los ligandos unidos

El aumento de la estabilidad alcalina de los ligandos después de su unión a un soporte puede someterse a ensayo usando técnicas bien conocidas en la materia y las descritas en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la estabilidad alcalina de los multímeros de los dominios de SpA unidos a una resina, *por ejemplo*, los dominios B y Z de SpA unidos a una resina de cromatografía, como se describe en el presente documento, puede confirmarse por tratamiento de la resina con NaOH 0,5 M. Debe entenderse que un aumento de la estabilidad significa que la capacidad de unión a IgG inicial se conserva durante un periodo de tiempo prolongado en comparación con el que puede conseguirse con la molécula de SpA natural. Por ejemplo, en el caso de la presente invención, después de 100 ciclos, cada uno incluyendo un tratamiento de 15 minutos con NaOH 0,5 N, el porcentaje de capacidad conservada de los ligandos de SpA, *por ejemplo*, los que comprenden dominios B o Z múltiples, es al menos 1,5 veces más, 2,0 veces más, 2,5 veces más o 3 veces más que el de la SpA natural. En una realización, la estabilidad alcalina del ligando unido, según se ensaya mediante la conservación de la capacidad de unión a IgG a lo largo del tiempo, se mide de la siguiente manera. La capacidad de unión, denominada Qd 50 %, se mide obteniendo el volumen de IgG cargada a una UV_{280nm} del 50 % de la concentración de IgG inicial. Primero se mide la Qd 50 % de la resina virgen inicial cargada en una columna. Después la resina se expone a aproximadamente 10 ciclos de 15 minutos de exposición a NaOH 0,5 N a 0,8 ml/min. De nuevo se mide la Qd 50 %. Este proceso se repite hasta que la resina se exponga a un total de aproximadamente 100 ciclos de NaOH 0,5 N. La Qd 50 % se mide una última vez y los resultados de las resinas fabricadas a partir de diferentes ligandos se comparan con la SpA natural.

En otro ensayo, la estabilidad cáustica o alcalina de las resinas se mide por inmersión estática de las resinas de interés. Sumergiendo una cantidad media de resina en NaOH 0,5 N durante 25 h con una suave rotación y midiendo la capacidad de unión a IgG antes y después de la inmersión en NaOH, puede determinarse la estabilidad alcalina mediante la conservación de la capacidad de unión de la resina.

VII. Procedimientos de purificación de una molécula diana usando un ligando de cromatografía de la invención

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de purificación de una molécula diana a partir de una mezcla usando los ligandos de cromatografía estables en medio alcalino descritos en el presente documento. La molécula diana puede ser cualquier molécula que reconozca un ligando de cromatografía estable en medio alcalino proporcionado en el presente documento, en el que el ligando esté acoplado a un soporte sólido. Los ejemplos de moléculas diana incluyen inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen cualquier fragmento de una inmunoglobulina que comprenda una región variable que aún se una específicamente a su antígeno conservando al mismo tiempo su capacidad de unirse específicamente a un ligando de proteína acoplado a un soporte sólido.

En algunas realizaciones, un procedimiento de aislamiento de una molécula diana de interés usando un ligando de cromatografía estable en medio alcalino descrito en el presente documento incluyen las etapas de: (a) poner en contacto un soporte sólido que incluya un ligando de cromatografía estable en medio alcalino basado en SpA unido con una mezcla que comprenda una molécula de interés en condiciones tales que la molécula diana se una específicamente al ligando; y (b) modificar las condiciones de tal manera que la molécula diana ya no se una al ligando, aislando de esta manera la molécula diana.

En algunas realizaciones, la etapa de modificación incluye modificar el pH, de tal manera que la molécula diana ya no se una al ligando. En una realización particular, el pH se modifica de tal manera que sea un pH más ácido que el de las condiciones de pH en la etapa (a). Por ejemplo, en una realización, la etapa (a) puede realizarse a un pH neutro, o a un pH que varíe de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 y el etapa (b) puede realizarse a un pH ácido, *por ejemplo*, un pH que varíe de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.

En otra realización, la etapa (b) comprende modificar la concentración salina del tampón en uso, de tal manera que la molécula diana ya no se una al ligando. Por ejemplo, en una realización, en la etapa (a) puede usarse una concentración salina elevada, *por ejemplo*, >0,1 M y en la etapa (b) puede usarse una concentración salina inferior, *por ejemplo*, <0,1 M. A la inversa, en algunas realizaciones, en la etapa (a) puede usarse una concentración salina baja, *por ejemplo*, <0,1 M y en la etapa (b) puede usarse una concentración salina elevada. En otras realizaciones más tanto el pH como la concentración salina del tampón pueden modificarse entre la etapa (a) y etapa (b).

Un experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones adecuadas para la unión de una molécula diana a un ligando y por lo tanto modificar las condiciones que alteren la unión de la molécula al ligando.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de una variante de dominio B de SpA que tiene una mutación n+1, en la que n representa una asparagina

En un experimento a modo de ejemplo, un gen sintético que codifica el “dominio B” de la proteína A se obtiene a partir de ADN 2.0 (Menlo Park, CA). El extremo 5' del gen incluye un codón para una metionina iniciadora así como seis codones de histidina en el extremo 3' del gen. El gen se proporciona en el vector pJ56:8620 del ADN 2.0. El vector parental pJ56 confiere resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol y gentamicina. Los sitios de las enzimas de restricción apropiados para la posterior clonación del gen en los vectores de expresión se introducen en el gen en ambos extremos 5' y 3'. En la Figura 5 se muestra un mapa plasmídico del vector.

Posteriormente se usa mutagénesis de saturación para mutar el ácido glutámico en la posición 24 por cualquier otro aminoácido natural excepto cisteína (C), serina (S), alanina (A), glicina (G), asparagina (N) y glutamina (Q) mediante procedimientos basados en PCR usando la ADN polimerasa Phusión de alta fidelidad (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los cebadores se adquieren de DNA IDT (Coralville, IA), como una solución 100 µM en tampón Tris EDTA. Los cebadores mutagénicos tienen la secuencia CTGCCGAACCTGAACNN SGAACAACGCAACGG (SEC ID N°: 41) en la que NNS representa las tres bases que codifican el aminoácido en la posición 24. La PCR se realiza en reacciones de 50 µl que contienen los dNTP (cada uno 0,2 mM), 125 ng de cada cebador, 50 ng de plásmido molde y 1 U de enzima Phusión. La PCR se realiza de acuerdo con el esquema indicado en la Tabla III.

Tabla III

Descripción del ciclo	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	30 segundos	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	18 ciclos
Hibridación	55 °C	60 segundos	
Extensión	68 °C	6 minutos	

Las reacciones PCR se tratan con la enzima de restricción *DpnI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) para reducir el fondo natural. A cada reacción PCR de 50 µl, se añaden aproximadamente 1 µl de enzima *DpnI* y las muestras se incuban durante aproximadamente una hora a 37 °C.

Células competentes NEB5α de *E. coli* (New England Biolabs, Ipswich, MA) se transforman con 2 µl de la reacción PCR tratada con *DpnI*. Las células se descongelan en hielo, y se añaden 2 µl de la reacción PCR a 25 µl de células. Después de aproximadamente 30 minutos de incubación en hielo, las células se someten a choque término durante 30 segundos a aproximadamente 42 °C. Se deja que las células se recuperen durante aproximadamente 5 minutos en hielo y después se añaden 125 µl de medio SOC (New England BioLabs). Las células se incuban durante aproximadamente una hora a 37 °C, y después 100 µl se siembran en placas sobre placas LB (Northeast Laboratory Services, Winslow, ME) que contienen ampicilina 100 µg/ml y se cultivan durante una noche a aproximadamente 37 °C. Los clones positivos se identifican ensayando la expresión de las proteínas en los lisados celulares totales usando SDS PAGE. Para obtener ADN purificado, se recogen colonias individuales para cultivar durante una noche en LB que contiene ampicilina 100 µg/ml. El ADN se purifica usando kits de centrifugación mini-prep de Qiagen (Valencia, CA).

El ADN purificado con mini-prep se secuenciar para confirmar la identidad de cada clon (MWG Biotech, Huntsville AL). El plásmido resultante se usa para transformar células competentes NEB5 α de *E. coli* como se ha descrito anteriormente.

Después de la identificación de los clones positivos, 35 ml de los cultivos de una noche se cultivan en caldo Terrific con ampicilina 100 μ g/ml y las células se sedimentan por centrifugación a 13.500 g durante 10 minutos. Los sedimentos se resuspenden en 10 ml de imidazol 20 mM en PBS (solución salina tamponada con fosfato), se lisan por ultrasonido y se centrifugan a 13.500 g durante 30 minutos para sedimentar los residuos insolubles. Posteriormente los lisados se aplican a 750 μ l de una resina Ni-NTA que está pre-equilibrada con 10 volúmenes de columna de imidazol 20 mM en PBS. Después de lavar con 20 volúmenes de columna de imidazol 20 mM en PBS, las muestras se eluyen de la resina con imidazol 200 mM en PBS. La proteína purificada se dializa durante una noche contra PBS usando casetes de diálisis Pierce Slide-A-Lyzer con un límite de peso molecular (MWCO) de 3,5. Después de la diálisis, la cuantificación de la proteína total se consigue usando el ensayo de Pierce MicroBCA y las muestras se conservan a -30 $^{\circ}$ C.

En las Figuras 6 y 7 se representan las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos del dominio B natural marcado con his y los diversos mutantes n+1.

Ejemplo 2: Ensayo de las proteínas expresadas con respecto a la estabilidad alcalina

Las construcciones marcadas con his de la SpA mutante y natural purificadas por afinidad descritas en el Ejemplo 1 se diluyen con agua MilliQ o con NaOH a una concentración final de 1 N y se incuban durante seis horas a temperatura ambiente. Se usan 6 columnas de filtración en gel de Biorad Micro Biospin para neutralizar y cambiar el tampón 50 μ l de cada muestra en PBS. La cuantificación de proteína total se consigue usando el ensayo MicroBCA de Pierce y las muestras se diluyen a 10 μ g/ml en PBS para cargar sobre la placa ELISA. Aproximadamente 200 μ l (2 μ g) de PrA tratada se absorben a los pocillos de una placa ELISA durante 2-24 horas a 37 $^{\circ}$ C. Las placas se bloquean en Tampón de Bloqueo Superblock de Pierce en PBS (Superblock-PBS) durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. A cada pocillo de la placa se le añade aproximadamente 200 μ l de gamma globulina humana de Sigma diluida a 0,05 mg/ml en Superblock-PBS (10 μ g) y se deja que proceda la unión durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS que contiene aproximadamente Tween20 al 0,05 % (PBS-T), las placas se incuban con 200 μ l de una dilución 1:10.000 de IgY de pollo conjugado con HRP suscitado contra IgG humana durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados finales con PBS-T, las placas se revelan con 100 μ l de ELISA TMB Pierce 1-Step Slow durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 100 μ l de HCL 1 N y la unión a IgG primaria se cuantifica como la lectura de absorbancia a 450 nm. Todas las muestras se ensayan por triplicado y los datos se analizan como el cambio en la unión a IgG primaria antes y después del tratamiento cáustico.

El resultado de un ensayo de experimento ejemplar con respecto a la estabilidad alcalina de los diversos mutantes del dominio B n+1 se resume en el gráfico de barras de la Figura 8. Las diversas construcciones se representan en el eje X y el porcentaje correspondiente de unión a IgG que se conserva después de seis horas de exposición a NaOH 1M se representa en el eje Y. Como se representa en el gráfico de barras de la Figura 8, diversos de los mutantes n+1 que tienen un aminoácido voluminoso en la posición 24 del dominio B presentan una estabilidad cáustica potenciada.

En otro experimento, los ligandos SpA que tienen dos o más dominios B o dos o más dominios Z de SpA se ensayan con respecto a la estabilidad alcalina usando el ensayo descrito anteriormente. En otro experimento más, los ligandos SpA que tienen tres dominios B (B3), cuatro dominios B (B4), cinco dominios B (B5), seis dominios B (B6) o siete dominios B (B7) se ensayan con respecto a la estabilidad alcalina usando el ensayo descrito anteriormente.

En un experimento ejemplar, el porcentaje de capacidad de unión a IgG residual de los ligandos B3, B4 y B5, ensayado usando el procedimiento basado en ELISA descrito en el presente documento es el siguiente. El ligando B3 conserva aproximadamente el 79 % de su capacidad de unión a IgG residual después de una exposición de seis horas a NaOH 1 M; el ligando B4 conserva aproximadamente el 86 % de su capacidad de unión a IgG residual después de una exposición de seis horas a NaOH 1 M; y el ligando B5 conserva aproximadamente el 83 % de su capacidad de unión a IgG residual después de una exposición de seis horas a NaOH 1 M. El ligando SpA natural (nPrA) solo conserva aproximadamente el 49 % de su capacidad de unión a IgG residual después de una exposición de seis horas a NaOH 1 M.

Ejemplo 3: Unión de SpA natural y variantes de SpA a un soporte sólido

Después de la generación de las diversas variantes de SpA e identificación de las que son estables en medio cáustico usando uno o más ensayos conocidos en la técnica y como se describe en el Ejemplo 2, las variantes de SpA se unen a un soporte, *por ejemplo*, a un soporte sólido. En un experimento ejemplar, usando epiclorohidrina se reticular perlas de agarosa (Sephacrose 4B) (GE Healthcare, Piscataway NJ) de acuerdo con un procedimiento previamente descrito (Porath y Fornstedt, J. Chromatography, 51: 479 (1979)). Las perlas de agarosa reaccionan con grupos asociativos cargados positivamente, *por ejemplo*, cationes, de acuerdo con el siguiente procedimiento: se añaden 50 ml de perlas a 40 g de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC) al 75 % en peso, 10 ml de agua Milli-

Q[®] (Millipore Corp., Billerica, MA) y 1,67 g de hidróxido de sodio al 50 % en peso. La reacción se agita vigorosamente (> 100 rpm) en un agitador rotatorio durante una noche a temperatura ambiente. Después, las perlas se filtran y se lavan con tres volúmenes de 100 ml de agua Milli-Q[®] (Millipore Corp, Billerica, MA).

- 5 Las perlas (50 ml, de torta filtrada) se añaden a agar que contiene 15 ml de NaOH 4,6 M. Se forma una suspensión con la mezcla y después se añaden 19,5 ml de diglicidil éter butanodiol (BUDGE). Esta mezcla se agita a 35 °C durante aproximadamente 2 horas. Después, las perlas se lavan con 750 ml de agua Milli-Q[®] (Millipore Corp, Billerica, MA) y se equilibran con 250 ml de NaHCO₃ 10 mM.

- 10 Inmediatamente después de la etapa de activación con BUDGE, se añaden 10 ml de la torta de perlas filtrada a 10 ml de una solución de NaHCO₃ 10 mM que contiene una concentración de 15 g/l de ligando SpA natural o ligando SpA de acuerdo con la presente invención. La mezcla se protege en un vial de vidrio y el vial gira en un hibridizador a 37 °C durante aproximadamente 2 horas. Después de dos horas, las perlas se lavan con 30 ml de agua Milli-Q[®] (Millipore Corp, Billerica, MA). La torta de perlas filtrada (10 ml) se añade a agar que contiene una solución de 10 ml que comprende 1 ml de tioglicerol y 9 ml de una solución tampón con NaHCO₃ 0,2 M y NaCl 0,5 M. Se forma una suspensión con la mezcla y gira durante una noche a temperatura ambiente. Después las perlas se lavan con 30 ml de los siguientes tampones: Tampón Tris 0,1 M (pH 8), Tampón Tris 0,1 M con NaCl 0,15 M (pH 8), Ácido Acético 50 mM (pH 4,5), PBS (pH 7,4) con acida sódica al 0,002 %.

- 20 Las muestras de resina acopladas con diferentes variantes de SpA se marcan de la siguiente manera: nPrA para SpA natural; Z3 para el ligando SpA que contiene tres dominios Z; E3 para el ligando SpA que contiene tres dominios E; D3 para el ligando SpA que contiene tres dominios D; A3 para el ligando SpA que contiene tres dominios A; C3 para el ligando SpA que contiene tres dominios C; B3 para el ligando SpA que contiene tres dominios B; B4 para el ligando SpA que contiene cuatro dominios B; B5 para el ligando SpA que contiene 5 dominios B; B5NF y B7NF contienen 5 y 7 dominios B, respectivamente y adicionalmente contienen una mutación G29A en la posición 29. Después de la unión a una resina, las diversas variantes SpA se someten a ensayo con respecto a la estabilidad alcalina.

25 **Ejemplo 4: Ensayos de capacidad de unión (Qd 50 %) de IgG a resinas antes y después de ciclado cáustico**

- En un experimento ejemplar, las diversas construcciones de SpA de acuerdo con la invención se sometieron a ensayo para determinar la capacidad de unión de IgG después de la unión a un soporte. En un experimento ejemplar, se usó un procedimiento convencional para ensayar la capacidad dinámica de resinas/medios usando IgG policlonal comercial. Resumiendo, una resina acoplada con un ligando SpA de acuerdo con la presente invención se relleno en una columna Omnifit (6,6 mm x 70 mm) en PBS, pH 7,4 y el caudal se ajustó a 300 cm/h. La columna rellena se equilibró con 10 volúmenes de columna (VC) de PBS. La IgG policlonal (Sigma-Aldrich, 2 mg/ml en PBS, pH 7,4) se cargó sobre la columna hasta que la UV_{280nm} alcanzó más del 50 % de la concentración de IgG inicial. Después del lavado con tampón de equilibrado, la IgG se eluyó con ácido cítrico 0,1 M, pH 3,0. Después de cada proceso, los medios se sanearon usando clorhidrato de guanidina 6 M. La Qd 50 % se calculó basándose en la cantidad de IgG cargada cuando la UV_{280nm} alcanzó el 50 % de la concentración de IgG inicial.

- Después de medir la capacidad dinámica inicial, los medios se expusieron a 10 ciclos de 15 minutos con NaOH 0,5 N (caudal de 100 cm/h) seguido de otra medición de capacidad dinámica de IgG. Posteriormente los medios se pusieron en contacto con otros 10 ciclos de 15 minutos de exposición a NaOH 0,5 N, seguido de otra medición de la capacidad de unión dinámica. La medición de la capacidad dinámica se realizó después de exponer cada muestra a 100 ciclos de 15 minutos con NaOH 0,5 N.

- En un experimento ejemplar, cuyos resultados se representan en la Figura 9, los trímeros de los dominios E, D, A, B, C y Z que contienen engarces con dominio natural B se unen a una resina de agarosa y su estabilidad cáustica se mide mediante la capacidad de unión dinámica a lo largo de 100 ciclos de exposición cáustica, incluyendo cada ciclo una exposición de 15 minutos a NaOH 0,5 N. Como se resumen en el gráfico de la Figura 9, el número de ciclos se representa en el eje X y la capacidad de unión de IgG se representa en el eje Y. Los trímeros del dominio C y Z presentan aproximadamente el mismo nivel de estabilidad cáustica. Los trímeros del dominio B son más estables n medio cáustico que los trímeros del dominio A, que no son más estables en medio cáustico que los trímeros de los dominios E y D.

Por lo tanto, el orden de estabilidad cáustica puede resumirse de la siguiente manera C y Z>B>A>E y D.

- 50 En otro experimento ejemplar, resinas de agarosa acopladas con variantes del dominio B: BBB (B3), BBBB (B4), BBBBB (B5), BBBBB-NF (B5-NF) y BBBBBBB-NF (B7-NF), se comparan con la SpA natural (nPrA) usando el ensayo descrito anteriormente para ensayar la capacidad de unión dinámica de IgG a lo largo de 100 ciclos de exposición cáustica, incluyendo cada ciclo una exposición de 15 minutos a NaOH 0,5 N. Como se resume en el gráfico de la Figura 10, el grado de estabilidad cáustica es directamente proporcional al número de dominios y adicionalmente, la mutación G29A para reducir la unión a Fab no afecta a la estabilidad cáustica.

La memoria descriptiva se entiende más detalladamente a la vista de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva que se incorporan por la presente por referencia. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de realizaciones en la presente invención y no deben considerarse

limitativas de su alcance. El experto en la materia reconoce fácilmente que, en la presente invención, pueden incluirse otras muchas realizaciones. Todas las publicaciones e invenciones se incorporan por referencia en su totalidad. Hasta el grado en el que el material incorporado por referencia contradiga o no sea coherente con la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva reemplazará cualquier material de este tipo. Las citas y cualquiera de las referencias indicadas en el presente documento no suponen una admisión de que dichas referencias sean de la técnica anterior a la presente invención.

A menos que se indique de otra manera, se entiende que todos los números que expresan cantidades de principios, cultivos celulares, condiciones de tratamiento y etcétera, usados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, se modifican en todos los casos mediante el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que pretenden obtenerse en la presente invención. A menos que se indique de otra manera, la expresión "al menos" delante de una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán constatar, usando solo experimentación rutinaria, muchos equivalentes con respecto a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Dichos equivalentes pretenden incluirse en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando de cromatografía estable en medio alcalino que comprende dos o más dominios B o dos o más dominios Z de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA), en el que dominio B comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 10, y el dominio Z comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 12, en el que los dos o más dominios B o los dos o más dominios Z se unen a una resina de cromatografía en más de un sitio sobre la resina mediante una unión multipunto, y adicionalmente en el que el ligando conserva al menos el 95 % de su capacidad de unión después de 5 horas de incubación en NaOH 0,5 M.
2. El ligando de cromatografía estable en medio alcalino de la reivindicación 1, en el que el ligando comprende tres o más dominios B o tres o más dominios Z de SpA; o en el que el ligando comprende cuatro o más dominios B o cuatro o más dominios Z de SpA; o en el que el ligando comprende cinco o más dominios B o cinco o más dominios Z de SpA; o en el que el ligando comprende seis o más dominios B o seis o más dominios Z de SpA; o en el que el ligando comprende siete o más dominios B o siete o más dominios Z de SpA.
3. El ligando de cromatografía estable en medio alcalino de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el ligando es capaz de unirse al menos 1,5 veces, o 2 veces, o 3 veces o más a IgG en comparación con la SpA natural, después de una exposición a NaOH 0,5 M durante al menos 5 horas.
4. El ligando de cromatografía de afinidad estable en medio alcalino de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende tres dominios B (B3), o cuatro dominios B (B4), o cinco dominios B (B5), o seis dominios B (B6) o siete dominios B (B7) de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA) unido a un soporte sólido mediante unión multipunto, en el que el grado de estabilidad cáustica del ligando está en el orden de $B3 < B4 < B5 < B6 < B7$, después de una exposición del ligando a NaOH 0,5 M durante al menos 5 horas.
5. El ligando de cromatografía de afinidad estable en medio alcalino de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende tres dominios Z (Z3), o cuatro dominios Z (Z4), o cinco dominios Z (Z5), o seis dominios Z (Z6) o siete dominios Z (Z7) de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA) unido a un soporte sólido mediante unión multipunto, en el que el grado de estabilidad cáustica del ligando está en el orden de $Z3 < Z4 < Z5 < Z6 < Z7$, después de una exposición del ligando a NaOH 0,5 M durante al menos 5 horas.
6. Una matriz de cromatografía que comprende un ligando de cromatografía de afinidad estable en medio alcalino de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Una matriz de cromatografía de afinidad estable en medio alcalino que comprende un ligando de cromatografía de afinidad estable en medio alcalino de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o seis o más, o siete o más dominios B o Z de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA) unido a un soporte sólido mediante unión multipunto.
8. La matriz de cromatografía estable en medio alcalino de la reivindicación 7, en la que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en vidrio de poros controlados, poli(alcohol vinílico), óxido de circonio, agarosa, polimetacrilato, poliácido, poliácridamida y poliestireno.
9. Un procedimiento de purificación por afinidad de una o más inmunoglobulinas procedentes de una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (a) proporcionar una muestra que comprenda una o más inmunoglobulinas;
 - (b) poner en contacto la muestra con la matriz de la reivindicación 6, 7 u 8 en condiciones tales que la una o más inmunoglobulinas se unan a la matriz; y
 - (c) recuperar la una o más inmunoglobulinas unidas eluyendo en condiciones adecuadas.

Figura 1

Secuencias de ADN de los dominios de unión a IgG naturales de la proteína A

SEC ID N°: 1- Secuencia de ADN del dominio E

GCGCAACAAAACGCTTTCTATCAGGTACTGAACATGCCTAACCTGAACGCCGATCAG
CGTAACGGCTTCATCCAAAGCCTGAAGGACGACCCGAGCCAGTCCGCAAACGTTCTG
GGTGAAGCTCAAAAACCTGAACGACAGCCAGGCACCGAAAGCTGAC

SEC ID N°: 2- Secuencia de ADN del dominio D

GCCCAACAGAACAAATTTAACAAGAGACCAGCAGTCCGCGTTCTACGAGATTCTGAAC
ATGCCTAACCTGAATGAAGAACAGCGCAACGGTTTATTTCAGTCTCTGAAGGACGAT
CCTTCTCAATCCACCAACGTAAGTGGGCGAAGCGAAGAACTGAACGAATCTCAGGCT
CCGAAG

SEC ID N°: 3- Secuencia de ADN del dominio A

GCCGACAACAACCTTCAACAAGAGCAGCAAAACGCTTTCTACGAAATCCTGAATATG
CCAAATCTGAACGAAGAGCAGCGTAACGGTTTCATCCAATCTCTGAAAGACGATCCG
TCCCAGTCCGCGAATCTGCTGGCGGAGGCTAAAAAGCTGAACGAATCCCAGGCTCCG
AAA

SEC ID N°: 4 Secuencia de ADN del dominio B

GCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCCTGCATCTG
CCGAACCTGAACGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTCAGAGCCTGAAAGACGACCCA
TCTCAGTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCG
AAA

SEC ID N°: 5- Secuencia de ADN del dominio C

GCGGATAACAAATTTCAACAAGGAGCAACAGAACGCATTCTATGAAATTCTGCACCTG
CCGAATCTGACGGAGGAGCAACGTAACGGCTTTATCCAGTCCCTGAAGGATGATCCG
TCTGTGTCTAAAGAGATCCTGGCGGAGGCAAAAAACTGAATGATGCACAAGCTCCG
AAA

Figura 2

SEC ID N°: 6- Secuencia de ADN del dominio Z

GTAGACAACAAATTCAATAAAGAACAGCAGAACGCTTTCTATGAAATCCTGCACCTG
CCGAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACGCGTTTATCCAGTCCCTGAAAGACGACCCG
AGCCAGAGCGCAAATCTGCTGGCGGAAGCGAAAAAGCTGAACGATGCCCAGGCGCCG
AAA

Figura 3

Alineamientos de las secuencias de los dominios de unión a IgG

E	-----AQQNAFYQVLNMPNINADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDQAPK	51 (SEC ID N°: 7)
D	ADAQONKFNKDQQSAFYEIILNMPNINNEEQNRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK	61 (SEC ID N°: 8)
A	--ADNN-FNKEQQNAFYEIILNMPNINNEEQNRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNESQAPK	58 (SEC ID N°: 9)
B	---ADNKFNKEQQNAFYEIILHLPNINNEEQNRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	58 (SEC ID N°: 10)
C	---ADNKFNKEQQNAFYEIILHLPNLTEEQNRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDQAPK	58 (SEC ID N°: 11)
	: ** ***::*:***. :***** * ;*:***::**** : ***** * ;*:***::****	

Figura 4

SEC ID N°: 12- Secuencia de aminoácidos del dominio Z

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKL
NDAQAPK

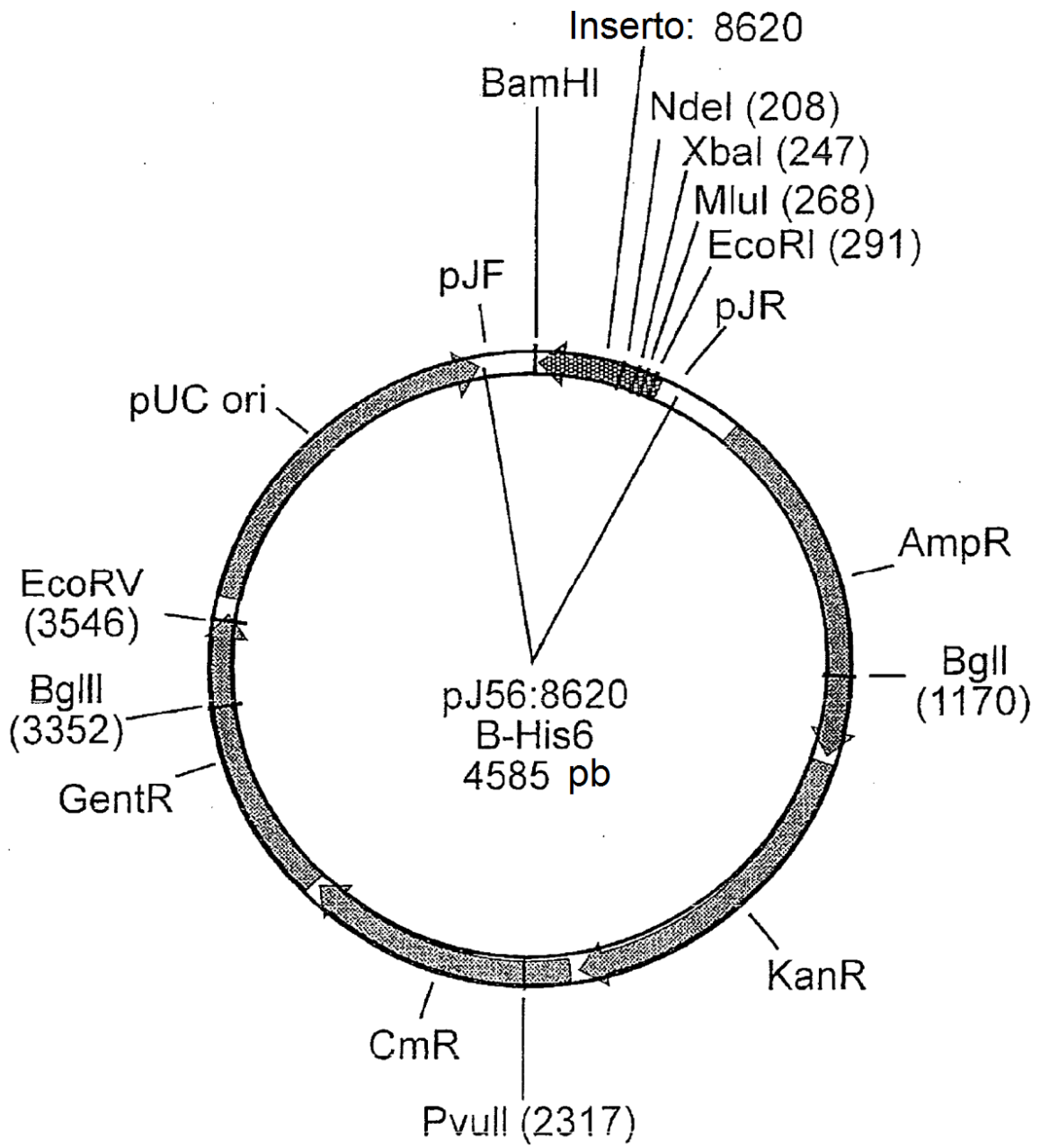


Figura 5

FIG. 6

Dominio B natural marcado con 6 histidinas (SEC ID Nº: 13)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24M (SEC ID Nº: 14)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNMEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24I (SEC ID Nº: 15)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNIEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24F (SEC ID Nº: 16)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNFEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24T (SEC ID Nº: 17)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNTEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24P (SEC ID Nº: 18)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNPEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24W (SEC ID Nº: 19)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNWEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24R (SEC ID Nº: 20)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNREQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24V (SEC ID Nº: 21)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNVEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24L (SEC ID Nº: 22)

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNLEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

FIG. 6 Continuación

E24Y (SEC ID Nº: 23)

MADNKFNKEQQNAFY EILHLPNLN YEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24H (SEC ID Nº: 24)

MADNKFNKEQQNAFY EILHLPNLN HEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24K (SEC ID Nº: 25)

MADNKFNKEQQNAFY EILHLPNLN KEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

E24D (SEC ID Nº: 26)

MADNKFNKEQQNAFY EILHLPNLN DEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKL
NDAQAPKHHHHHH

FIG.7

Dominio B natural marcado con 6 histidinas (SEC ID N°: 27)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGAAAGAAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24M (SEC ID N°: 28)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGATGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24I (SEC ID N°: 29)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGATAGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24F (SEC ID N°: 30)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGTTGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24T (SEC ID N°: 31)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGACAGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24P (SEC ID N°: 32)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGGCAGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24W (SEC ID N°: 33)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24R (SEC ID N°: 34)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGGCGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGC

FIG. 7 Continuación

TAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCACCCTA
ATAAGGATCC

E24V (SEC ID Nº: 35)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGCTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24L (SEC ID Nº: 36)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGCTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24Y (SEC ID Nº: 37)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGCTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24H (SEC ID Nº: 38)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGCTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24K (SEC ID Nº: 39)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGCTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

E24D (SEC ID Nº: 40)

GAATTCTAATACGACTCACTATAACGCGTCCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTT
AAGAAGGAGATATACATATGGCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCC
TGCTCTGCCGAACCTGCTGGGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTCA
GTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAACATCATCACCATCA
CCACTAATAAGGATCC

Figura 8

