

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 256**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2005 E 05817207 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1817342**

54 Título: **Método para la purificación por afinidad**

30 Prioridad:

02.12.2004 EP 04078282

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

19.06.2013

73 Titular/es:

**BAC IP B.V. (100.0%)
HUIZERSTRAATWEG 28
1411 GP NAARDEN, NL**

72 Inventor/es:

**HERMANS, WILHELMUS, JOSEPHUS, JOHANNA;
TEN HAAFT, MARK, RONALD y
OVERWEEL, ANJA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 408 256 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la purificación por afinidad.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para la purificación por afinidad y a un agente de unión para usar en ese proceso.

10 Antecedentes de la invención

El uso de agentes de unión en la purificación por afinidad se conoce a partir de EP-A-434317. Este documento da a conocer que es posible inmovilizar agentes de unión específicos pequeños en un portador de fase sólida. Los agentes de unión están compuestos especialmente de los dominios VH y VL de las proteínas correspondientes, mantenidos juntos por su interacción natural. En la inmovilización estos agentes pequeños mantienen la afinidad por su ligando diana. Un ejemplo de la tecnología dada a conocer es la inmovilización de un Fv anti-lisozima en agarosa y su uso como un inmunoabsorbente. El inmunoabsorbente con el Fv anti-lisozima inmovilizado se empacó en una columna y en esta columna se cargó una mezcla de lisozima y otras proteínas. La columna se lavó para eliminar la proteína no unida y posteriormente se eluyó la proteína unida.

20 En este tipo de sistemas de inmunoafinidad la fuerza de unión, la especificidad y la capacidad del inmunoabsorbente son parámetros importantes.

25 La fuerza de unión y la especificidad se refieren a la unión entre el agente de unión y la diana. Especialmente el agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de éste, y la unión es altamente específica para la diana. Es deseable que la unión específica a la diana se maximice y la unión no específica se minimice. La unión con sólo una especificidad muy limitada está subyacente en los sistemas de purificación comerciales que se basan en la proteína A y la proteína L. Se sabe que éstos se unen a una amplia gama de moléculas de inmunoglobulina como las inmunoglobulinas de humano, ratón y rata.

30 La fuerza de la unión se debe equilibrar entre una buena unión de modo que la columna se cargue fácilmente con el material que es la diana y el material que no es la diana sea eluido antes de la elución de la diana, y el deseo de utilizar condiciones de elución suaves para evitar daños innecesarios a las moléculas diana. Las condiciones de elución muy rigurosas son indeseadas porque conducen a la desnaturalización, fragmentación u otros defectos del material diana. Además las condiciones suaves son beneficiosas para el material de la columna y aumentan la vida útil de la misma.

35 La capacidad del inmunoabsorbente indica la cantidad de material diana que puede ser unido por el material inmunoabsorbente en condiciones de unión. Una vez que se obtiene la capacidad máxima del material inmunoabsorbente, la carga adicional de la diana no se unirá sino que causará fugas del material diana en el eluyente. Esto resulta en una pérdida de rendimiento en la purificación de proteínas o requiere la inclusión de pasos del proceso adicionales (repetidos) .

45 En EP-A-434317 algunos de estos objetivos se abordan por ejemplo mediante el uso de dominios variables que tienen una afinidad reducida por el antígeno, llevando a la elución o desorción en condiciones más suaves. La unión no específica se reduce al reducir el tamaño del agente de unión hasta el mínimo requerido para la unión.

50 McNahon et al. (2000, Journal of Immunological methods 241:1-10) dan a conocer una IgM monoclonal murina anti-IgG de cabra designado M11. Los autores describen que este anticuerpo monoclonal fue mono reactivo antes de la purificación, mientras que fue poli reactivo para muchas proteínas diferentes después de la purificación.

55 Lambin et al. (1993, Journal of Immunological methods 165:99-111) dan a conocer un método para purificar en gran medida una fracción de IgG4 que contiene predominante anticuerpos anti-polen con actividad de bloqueo en una columna de inmunoafinidad que contiene anticuerpos monoclonales humanos.

60 Bird et al. (1984, Journal of Immunological methods 71:97-105) dan a conocer el uso de anticuerpos monoclonales murinos específicos de la subclase humana (anti-IgG1; anti-IgG2; anti-IgG3; anti-IgG4 específicos) y restringidos a la subclase humana (anti-IgG2, 3 y 4, no IgG1; anti-IgG1, 2 y 4, no IgG3; anti-IgG1, 2 y 3, no IgG4) para estandarizar los procedimientos de inmunoafinidad para permitir el aislamiento de las preparaciones de subclases policlonales puras.

65 Monestier et al. (1989, Hybridoma 8(6):631-638) dan a conocer un método para la purificación de anticuerpos IgM murinos. Los autores dan a conocer la inmunización de ratas con un anticuerpo monoclonal murino IgM-kappa (TEPC 183) y tres semanas más tarde con un anticuerpo monoclonal murino IgM-lambda (MOPC 104E), para generar anticuerpos monoclonales de rata para IgM murino. Se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales de rata que se unen tanto a TEPC 183 como a MOPC 104E. Se observó que la unión es independiente de la cadena ligera.

WO 2004/041862 da a conocer polipéptidos anti-factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) que contienen uno o más anticuerpos de dominio único dirigidos contra TNF-alfa. Además, se dio a conocer su uso en diagnóstico y tratamiento.

5 WO 2004/041867 da a conocer un método de administración de moléculas de proteína terapéuticas por vías de administración diferentes para evitar la inactivación. La solicitud da a conocer un constructo polipeptídico que contiene al menos un anticuerpo de dominio único dirigido contra la región constante de IgE.

10 Ewert et al. (2002, Biochemistry 41:3628-3636) presentan propiedades biofísicas de dominios VHH de camélidos comparadas con las propiedades de dominios VH3 humanos. Los autores concluyen que los fragmentos VHH de camélidos se caracterizan por una estabilidad favorable y por su capacidad para fundirse reversiblemente sin agregación, permitiendo así que los fragmentos recuperen la afinidad de unión después de la renaturalización por calor.

15 Pérez et al. (2001, Biochemistry 40:74-83) investigan la termoestabilidad de anticuerpos de cadena pesada de camélidos.

20 Muyldermans y Lauwereys (1999, Journal of Molecular Recognition 12:131-140) presentan un informe sobre anticuerpos de camélidos sólo de cadena pesada. Los autores discuten el anticuerpo de cadena única versus anticuerpos tradicionales e indican que esperan que los anticuerpos de dominio único de camélidos tengan utilidad en un número de aplicaciones biotecnológicas o médicas.

25 Van der Linden et al. (2000, Journal of Immunological methods 240:185-195) se plantean si las llamas son una fuente práctica de fragmentos VHH específicos para el antígeno y concluyen que los fragmentos VHH de anticuerpos específicos para el antígeno son fácilmente accesibles del anticuerpo de llama desarrollado contra la gonadotropina coriónica humana.

30 Aunque estas medidas hasta cierto punto pueden mejorar la capacidad, la especificidad y las características de afinidad del inmunoabsorbente, persiste el deseo de contar con materiales inmunoabsorbentes mejores.

Resumen de la invención

35 Encontramos sorprendentemente que un material inmunoabsorbente que contiene un agente de unión específica, que es preferentemente un anticuerpo o un fragmento de éste, que se une al menos a dos epítomos de una diana, tiene la elevada afinidad deseada siendo posible aún realizar la elución en condiciones suaves. Cuando se utiliza como material para cromatografía en columna se encontró que da lugar a una alta capacidad de la columna. Por lo tanto la invención se refiere a un método para la purificación de una inmunoglobulina, donde:

- 40 a) el método comprende el paso de unir la inmunoglobulina a un material inmunoabsorbente que contiene al menos un agente de unión monoespecífico;
- b) el agente de unión tiene afinidad por al menos dos epítomos de la inmunoglobulina que están espacialmente separados por al menos 30 angstrom; y,
- 45 c) el agente de unión monoespecífico es un dominio variable de un anticuerpo que se puede obtener de un camélido que comprende sólo cadenas pesadas y que está naturalmente desprovisto de cadenas ligeras.

50 En otro aspecto la invención se refiere a un método para purificar una molécula diana por inmunoafinidad, donde la molécula diana es una inmunoglobulina y el método comprende utilizar un material inmunoabsorbente que contiene al menos dos agentes de unión diferentes, donde los agentes de unión consisten en un agente de unión con afinidad de unión por un epítomo (uno) de la molécula diana y un agente de unión con afinidad de unión por un epítomo distinto (dos) de la molécula diana.

Descripción de la invención

55 La molécula diana se define como una molécula que se debe unir a un agente de unión como un anticuerpo. Los ejemplos de moléculas diana son proteínas que requieren purificación, proteínas que se deben identificar.

60 La afinidad de unión (KD) se define en el contexto de la unión específica y se representa por una afinidad de al menos $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Preferentemente la afinidad de unión (medida en el agente de unión aislado y la diana), es al menos $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ más preferentemente al menos $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

65 El material inmunoabsorbente se entiende en este documento que significa la combinación de un portador y un agente de unión que se inmoviliza en el portador. El portador puede ser cualquier material que se pueda utilizar para la inmovilización de un agente de unión. Los ejemplos adecuados son los materiales de matriz, para atrapar el agente de unión, las superficies de las células en las que aparece el agente de unión y los polímeros que se pueden unir covalentemente al agente de unión. Un experto en el área de la cromatografía de afinidad conoce muy bien los

portadores adecuados como p. ej. sefarosa. El agente de unión se inmoviliza preferentemente en el portador mediante un enlace covalente.

5 Un epítipo se define como la porción de la molécula diana a la que se une el agente de unión. Si el agente de unión es un anticuerpo, es la porción de una molécula diana que desencadena una respuesta inmunológica en la inmunización de una especie con esta molécula. Generalmente es el sitio de la molécula diana donde tiene lugar la unión a un anticuerpo.

10 El epítipo está preferentemente presente naturalmente en la molécula diana. Opcionalmente el epítipo o los epítipos son una secuencia que se ha incluido artificialmente en la molécula diana. Opcionalmente una multitud de los mismos o distintos epítipos se incluye en la molécula diana para facilitar su purificación y detección.

15 El agente de unión es un componente que se une específicamente a la molécula diana con la afinidad de unión deseada. El agente de unión es un agente de unión mono-específico. Una composición que contiene un agente de unión mono-específico, como los materiales inmuno-adsorbentes de la presente invención, se entiende que significa una composición que tiene una población homogénea del agente de unión. Se deduce que el agente de unión mono-específico es específico para un solo epítipo o ligando. Sin embargo está expresamente incluido en la invención que el material inmuno-adsorbente puede comprender más de un tipo de agente de unión mono-específico, que cada uno consiste en una población homogénea. Habitualmente, sin embargo, en el contexto de la presente invención, un material inmuno-adsorbente no contendrá más de 4, 6, 8, 10 ó 20 agentes de unión mono-específicos diferentes. Se prefiere mucho que el agente de unión sea un anticuerpo o un fragmento de éste. En ese caso el agente de unión mono-específico será por lo tanto un anticuerpo monoclonal o un fragmento de éste, que se puede obtener de un hibridoma o ser expresado a partir de una secuencia de codificación clonada. La expresión agente de unión mono-específico, según se usa en este documento, excluye por lo tanto los anticuerpos policlonales y los antisueros. Un ejemplo de un fragmento adecuado que se puede utilizar es la parte de unión del anticuerpo, denominada CDR, (región determinante de la complementariedad). Dichos fragmentos se pueden insertar adecuadamente en una molécula andamio natural o sintética como un péptido sintético. La invención se refiere a un método de purificación por inmunoafinidad, que comprende el uso de un agente de unión, que se une a una molécula diana en al menos dos posiciones. Esto se conoce como unión polivalente. En una realización el agente de unión se une a un epítipo que está presente al menos dos veces en la molécula diana. En otra realización el método utiliza a al menos dos agentes de unión, que cada uno se une a epítipos distintos de la molécula diana.

35 En consecuencia la invención se refiere a un método para la purificación de una molécula diana por inmunoafinidad, que comprende usar un material inmuno-adsorbente que contiene un agente de unión, que consiste en

- a) un agente de unión con afinidad de unión por un epítipo que está presente al menos dos veces en la molécula diana
- b) o consiste en un agente de unión con afinidad de unión por un epítipo (uno) en la molécula diana y un agente de unión diferente con afinidad de unión por un epítipo distinto (dos) de la molécula diana.

40 A continuación se presentan otros pasos preferidos de este método.

45 En una realización alternativa, la invención se refiere a un método para purificar una molécula diana por inmunoafinidad que comprende el uso de un agente de unión de acuerdo con (a) o (b) anteriores, en combinación con al menos un agente de unión que presenta unión monovalente a la molécula diana. Dichas combinaciones de múltiples agentes de unión son especialmente adecuadas para usar si el agente de unión individual tiene una afinidad de unión por la diana menor de $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

50 Opcionalmente el método de la invención es una combinación de (a) y (b) anteriores.

55 En una realización preferida, la invención se refiere a un método para purificar una molécula diana, donde el método comprende el paso de unir la molécula diana a un material inmuno-adsorbente que contiene al menos un agente de unión mono-específico, y donde el agente de unión tiene afinidad por al menos dos epítipos de la molécula diana que están separados espacialmente.

60 Preferentemente, la separación espacial de los al menos dos epítipos de la molécula diana es tal que la unión de un primer epítipo de la molécula diana a un agente de unión no interfiere sustancialmente con la unión de un segundo o más epítipos a un agente de unión. Esto significa que la unión de un primer epítipo de la molécula diana a un agente de unión no reduce sustancialmente ni bloquea la unión de un segundo o más epítipos de la molécula diana a un agente de unión. La ausencia de un bloqueo sustancial se entiende en este documento en el sentido de que la unión de un primer epítipo de la molécula diana a un agente de unión no reduce la unión de un segundo o más epítipos a un agente de unión en más de 50, 40, 30, 20, 10 o 5%. La ausencia de bloqueo sustancial se puede determinar en ensayos de bloqueo cruzado estándar (véase por ejemplo "Using Antibodies" E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, 1999) o como se describe en el ejemplo 5 en este documento.

La separación espacial de los al menos dos epítomos de la molécula diana es por lo tanto preferentemente tal que al menos dos epítomos de la molécula diana están disponibles para unirse a un agente de unión del material inmunoabsorbente. La separación espacial de los al menos dos epítomos es por lo tanto tal que resulta en la unión polivalente. La unión polivalente da como resultado una velocidad de disociación (k_{diss}) significativamente menor de la molécula diana para el material inmunoabsorbente que contiene el o los agentes de unión y valores de K_D significativamente mayores. Preferentemente la presencia de al menos dos epítomos separados espacialmente en la molécula diana produce al menos un aumento de 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 veces en la afinidad o valor de K_D para el material inmunoabsorbente que contiene un agente de unión en comparación con la afinidad o valor de K_D de una molécula diana que contiene una sola copia del mismo epítomo. En el presente documento se entiende que 120 fM es una afinidad o valor de K_D mayor que por ejemplo 6.3 nM. La presencia de al menos dos epítomos separados espacialmente en la molécula diana produce, por lo tanto induce, avidez por el material inmunoabsorbente que contiene un agente de unión, en comparación con una molécula diana que contiene una sola copia del epítomo. Avidez se entiende en este documento que se refiere a la fuerza de unión de una molécula diana con múltiples sitios de unión con un complejo más grande de agentes de unión, es decir la fuerza de unión de la unión polivalente. Afinidad, por otra parte se refiere a sistemas de ligando receptor monovalentes simples.

Por lo tanto en una realización preferida, la avidez del material inmunoabsorbente por la molécula diana es al menos 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 veces superior que la menor afinidad de un agente de unión por un epítomo individual de la molécula diana. La menor afinidad en este documento se refiere a la situación en la que el material inmunoabsorbente contiene más de un tipo de agente de unión para epítomos inmunológicamente distintos de la molécula diana y donde cada tipo individual de agente de unión tiene una afinidad diferente por su epítomo. En la situación en la que un solo tipo de agente de unión se une a un epítomo que está repetido en la molécula diana, la menor afinidad es la afinidad del agente de unión por una molécula de prueba que contiene únicamente una sola copia del epítomo.

La separación espacial de los al menos dos epítomos de la molécula diana es por lo tanto preferentemente tal que, la capacidad de unión dinámica del material inmunoabsorbente que contiene un agente de unión para la molécula diana, está aumentada en al menos 10, 20, 50, 100 o 200% en comparación con la capacidad de unión dinámica del material para una molécula diana que contiene únicamente una sola copia del epítomo. La capacidad de unión dinámica (DBC) se define en el presente documento como el área del pico de elución dividida por el área del pico total (flujo + elución) y esto multiplicado por la cantidad de molécula diana (véase ejemplo 3).

Otra característica importante de la invención actual es que aunque la unión polivalente de la molécula diana al material inmunoabsorbente conduce a afinidades de unión o avidez elevadas por la molécula diana, la liberación de dichas moléculas aún se puede obtener en condiciones de elución suaves. Por lo tanto, en una realización preferida la avidez de un material inmunoabsorbente que contiene un agente de unión por la molécula diana es al menos $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ o $1 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$. Preferentemente, en el mismo al menos el 90% de la molécula diana se puede eluir del material inmunoabsorbente a un pH de 2.5, 2.75, 3.0, 3.25, 3.5 o superior. Sin embargo, preferentemente las afinidades individuales de un agente de unión por el un epítomo de la molécula diana, son menos de $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ o $1 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$.

Las características, definidas antes, de unión de la molécula diana al material inmunoabsorbente se pueden lograr cuando los al menos dos epítomos de la molécula diana están separados espacialmente por al menos 10, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 Ångstrom.

En los métodos de la invención, los al menos dos epítomos de la molécula diana pueden ser al menos dos epítomos inmunológicamente distintos. En cuyo caso son necesarios por lo menos dos agentes de unión distintos en el material inmunoabsorbente, preferentemente uno para cada epítomo inmunológicamente distinto.

Alternativamente, en los métodos de la invención, los al menos dos epítomos de la molécula diana pueden ser al menos dos epítomos inmunológicamente idénticos que están repetidos en la molécula diana. En cuyo caso se requiere sólo un único tipo de agente de unión en el material inmunoabsorbente. Las moléculas diana con repeticiones de epítomos son por ejemplo proteínas homomultiméricas como por ejemplo las inmunoglobulinas que contienen 2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas.

El método comprende preferentemente un paso de selección del agente de unión. Esta selección se realiza preferentemente en condiciones que simulan las condiciones de carga y de elución para encontrar un agente de unión que se una con suficiente afinidad para unir la molécula diana al cargar y que también pueda ser eluido fácilmente.

En una realización de la invención, el agente de unión debe tener afinidad de unión por un epítomo que aparece al menos dos veces en la molécula diana. Mediante esta selección se eligen los agentes de unión, especialmente los anticuerpos o fragmentos de éstos, los cuales podrían proporcionar unión polivalente a una molécula diana. En el uso, dos agentes de unión individuales, especialmente las moléculas de anticuerpos, se pueden unir a epítomos distintos de la misma molécula diana, conduciendo a la unión polivalente de la molécula diana. Esta polivalencia aumenta la afinidad de unión y la capacidad del inmunoabsorbente con niveles sorprendentemente altos. Sin querer

adherir a ninguna teoría, se cree que la unión polivalente es esencial para alcanzar la elevada afinidad, o más bien avidez, la elevada capacidad de unión dinámica y la elución suave que son los objetivos de la invención actual.

5 Los ejemplos de dichos anticuerpos o fragmentos de éstos son los anticuerpos que reconocen específicamente un epítopo que está presente en la cadena ligera kappa o lambda de los anticuerpos humanos. En este ejemplo el anticuerpo humano es la molécula diana. Los anticuerpos humanos contienen dos cadenas ligeras kappa, que contienen los epítomos.

10 En otra realización de la invención en el paso de selección, se eligen al menos dos agentes de unión, que consisten en un agente de unión con afinidad de unión por un epítopo (uno) de la molécula diana y un agente de unión con afinidad de unión por un epítopo distinto (dos) de la molécula diana. En el uso, el material adsorbente estará formado por estos dos agentes de unión diferentes, especialmente anticuerpos o fragmentos de éstos, que se pueden unir simultáneamente a la misma molécula diana, nuevamente conduciendo a la unión polivalente de la molécula diana.

15 Como se mencionó antes la unión polivalente de la molécula diana, es decir, que cada molécula diana se una al material inmunoabsorbente a través de al menos dos uniones agente de unión-epítopo, es un aspecto preferido de la invención actual.

20 Se comprenderá que la unión polivalente tendrá lugar óptimamente si la estructura tridimensional de la molécula diana es tal que permite esta unión múltiple. En la práctica esto significa que hay preferentemente presente una cierta distancia entre los dos epítomos de la molécula diana. La idoneidad de la molécula diana para la unión polivalente se puede derivar de su estructura cristalina 3D.

25 A la elección de los anticuerpos o fragmentos la sigue preferentemente su producción en grandes cantidades. Los sistemas de producción adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* u otros sistemas de expresión en levaduras, mohos o bacterias.

30 Preferentemente a la producción la sigue un paso donde el agente de unión se pone en contacto con material inmunoabsorbente. El inmunoabsorbente y el agente de unión se pueden unir covalentemente o a través de otras interacciones. Preferentemente el agente de unión se acopla covalentemente a un material inmunoabsorbente. Se conocen muchos protocolos para inmovilizar proteínas o fragmentos en material adsorbente.

35 Se comprenderá que cuando se hace referencia a inmunoabsorbente que contiene "uno" o "un" agente de unión, esto pretende referirse también a la situación en la que un material inmunoabsorbente está cargado con muchas moléculas de agente de unión individuales.

40 Los ejemplos de material inmunoabsorbente adecuado incluyen materiales portadores de fase sólida porosos como agarosa, poliestireno, vidrio de poro controlado, celulosa, dextranos, diatomita, polímeros sintéticos como Sepharose™, sílice amorfa porosa. Los materiales portadores pueden estar en cualquier formato adecuado como partículas, polvos, láminas, perlas, filtros y análogos. Por ejemplo, otras especificaciones de materiales portadores adecuados se dan a conocer en EP-A-434317.

45 Se dispone de métodos para inmovilizar ligandos rápidamente, fácilmente y con seguridad a través de un grupo funcional elegido. La elección correcta del método de acoplamiento depende de la sustancia a inmovilizar. Por ejemplo los derivados de Sepharose™ comercialmente conocidos siguientes, permiten la inmovilización conveniente de proteínas en ellos: Sepharose™ 4B activada con CnBr permite que los ligandos que contienen grupos amino primarios se inmovilicen rápidamente mediante una reacción espontánea.

50 AH-Sepharose™ 4B y CH-Sepharose™ 4B ambas tiene un brazo espaciador de seis carbonos de largo y permiten el acoplamiento a través de grupos carboxilo y amino, respectivamente. Los espaciadores flexibles son adecuados para usar en situaciones en las que la flexibilidad de las moléculas diana está limitada o en las que la estructura tridimensional de la diana exige cierta flexibilidad del agente de unión para permitir una unión óptima.

55 La CH-Sepharose™ 4B activada proporciona un brazo espaciador de seis carbonos y un éster activo para el acoplamiento espontáneo a través de grupos amino.

Estos son sólo algunos ejemplos de rutas de inmovilización adecuadas.

60 Opcionalmente el material inmunoabsorbente se coloca en una columna para facilitar las separaciones cromatográficas.

65 En un paso siguiente preferido, el material inmunoabsorbente se pone en contacto con una composición que contiene la diana. A menudo la composición será una composición acuosa con muchas otras proteínas además de la diana que debe ser purificada. Las condiciones de este paso de contacto son tales que se produce la unión del agente de unión a la molécula diana.

Preferentemente en este paso se utiliza una solución amortiguadora de carga con un pH de alrededor de 6.5 a 8. Una solución amortiguadora adecuada es la solución amortiguadora PBS.

Se prefiere que el material cargado se enjuague hasta que hayan eluido los compuestos de unión no específicos.

La desorción de la molécula diana es el paso siguiente. Éste se lleva a cabo preferentemente cambiando las condiciones de modo que el anticuerpo o el fragmento ya no se unan a la molécula diana.

La elución se puede conseguir modificando las condiciones con respecto al pH, la sal, la temperatura o cualquier otra medida adecuada. Un método de elución preferido para la desorción es la elución con una solución amortiguadora que tenga un pH inferior a 3.

Más específicamente la invención se refiere a un método para la purificación de una molécula diana por inmunofinidad que comprende los pasos de:

- a) seleccionar un anticuerpo o un fragmento de éste, que se una a un epítipo que esté presente al menos dos veces en la molécula diana;
- b) unir el anticuerpo o el fragmento de éste al material inmunoabsorbente;
- c) cargar el material inmunoabsorbente con una composición que contenga la molécula diana, preferentemente en condiciones en las que tenga lugar la unión polivalente del agente de unión a la molécula diana;
- d) lavar el inmunoabsorbente cargado para eliminar los compuestos de unión no específicos; y,
- e) eluir la molécula diana mediante la aplicación de condiciones de elución.

El agente de unión se puede derivar de cualquier organismo adecuado o se puede elaborar sintéticamente o mediante organismos modificados genéticamente. Es importante que el fragmento conserve la afinidad de unión según se definió antes en el contexto de esta invención.

Los ejemplos de fragmentos adecuados son los fragmentos Fab y los fragmentos Fv.

En una realización preferida, los agentes de unión son anticuerpos, más preferentemente dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se derivan de anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Dichos anticuerpos se obtienen por ejemplo por inmunización de llamas o tiburones y purificación de los anticuerpos así generados. Esos anticuerpos contienen sólo cadenas pesadas y están desprovistos de cadenas ligeras. La ventaja del uso de esos anticuerpos es que son excepcionalmente estables incluso a temperaturas más altas, son pequeños y se producen fácilmente en organismos huéspedes como *Saccharomyces cerevisiae*. Esos anticuerpos se describen con más detalle en EP-A-656946.

En términos generales, el agente de unión contiene preferentemente un dominio variable derivado de una inmunoglobulina que comprende un sitio de unión con el antígeno completo para un epítipo de la molécula diana en una cadena polipeptídica única. Dichos agentes incluyen por lo tanto específicamente, pero no exclusivamente:

- 1) anticuerpos que se pueden obtener de camélidos y tiburones que constan sólo de cadenas pesadas y están naturalmente desprovistos de cadenas ligeras;
- 2) dominios variables de los anticuerpos definidos en 1), generalmente conocidos como dominios VHH;
- 3) formas obtenidas por ingeniería genética de los anticuerpos que se definen en 1) como por ejemplo anticuerpos "camelizados" en los cuales se injertan secuencias de la infraestructura (framework) de un dominio VHH de camélido (o tiburón) con CDR obtenidas de otras fuentes;
- 4) formas obtenidas por ingeniería genética de dominios variables tipo inmunoglobulina en las cuales se combinan secuencias de la infraestructura de diversas moléculas tipo inmunoglobulina con CDR específicas para una molécula diana determinada como p. ej. como se describe en WO 04/108749.

Una definición de CDR y secuencias de la infraestructura se proporciona en este documento más adelante. Se comprende además que la secuencia de aminoácidos de la infraestructura de un dominio variable derivado de una inmunoglobulina que contiene un sitio de unión con el antígeno completo para un epítipo de la molécula diana en una cadena polipeptídica única tiene preferentemente al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la infraestructura de alguna de las SEC. ID N°: 1 a 33. Preferentemente el dominio variable derivado de una inmunoglobulina tiene una afinidad por el epítipo según se definió antes en este documento.

Un agente de unión preferido es un fragmento de anticuerpo de dominio único derivado de un anticuerpo de camélido. Derivado de un anticuerpo de camélido sólo significa en este documento que las secuencias de aminoácidos de la infraestructura del fragmento son las definidas antes, pero que el fragmento se puede diseñar y sintetizar en vez de ser obtenido directamente o de ser formado en un organismo camélido.

Hemos encontrado que el material inmunoabsorbente de la invención, que contiene un agente de unión que se une específicamente a la cadena ligera kappa de los anticuerpos humanos, presenta muy buena afinidad y capacidad, y necesita sólo condiciones de elución suaves.

- 5 Por lo tanto en una realización específica, la invención se refiere a un material inmunoabsorbente que contiene un agente de unión con afinidad de unión por la cadena ligera kappa de los anticuerpos humanos.

La invención se refiere además a la utilización de dicho material en la purificación de anticuerpos humanos.

- 10 En una realización la invención se refiere a un agente de unión que se selecciona del grupo de moléculas VHH que se unen a la cadena ligera kappa seleccionadas entre las SEC. ID N°: 1 a 15, o un agente de unión que contiene un dominio variable derivado de una inmunoglobulina, que contiene una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 y/o 3 que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidad de aminoácidos con las CDR de las moléculas VHH de las SEC. ID N°: 1 a 15. Preferentemente, los dominios variables derivados de inmunoglobulinas tienen una
15 afinidad por la cadena ligera kappa de los anticuerpos humanos que es al menos $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$ o $10^8 M^{-1}$. Las CDR 1, 2 y 3 pueden, cada una, exhibir individualmente las identidades definidas antes o las CDR pueden, colectivamente, exhibir las identidades definidas antes.

- 20 Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 o 3 de las moléculas VHH se definen en el presente documento como se muestra en las figuras 3 y 4. Más generalmente, las CDR de los dominios variables de cadena pesada de camélidos se definen en el presente documento como las describen Vu et al (1997, Mol Immunol. 34(16-17): 1121-31). Las secuencias VHH distintas de las secuencias CDR de SEC. ID N°: 1 a 33 o como las que definen Vu et al. (1997, supra) se definen en este documento como secuencias de la infraestructura de VHH.

- 25 En otra realización más específica la invención se refiere a un material inmunoabsorbente que contiene un anticuerpo o un fragmento activo de éste que tiene la secuencia de aminoácidos que se especifica a continuación como secuencia ID 1.

Sequence ID 1:

30 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTISRYAMSWFRQAPGKEREFVAVARRSGDGAIFYADSVQGRFTV
SRDDAKNTVYVQLQMNSLKFEDTAVVYCAIDSDTFYSGSYDYWGQGTQVTVSS

- 35 En otra realización la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento que tiene afinidad de unión por un anticuerpo humano, cuyas secuencias comprenden la secuencia de acuerdo con la secuencia ID N° 1 o son esencialmente homólogas a ella. En el contexto de la invención esencialmente homóloga significa que la molécula homóloga tiene la afinidad de unión deseada de al menos $10^6 M^{-1}$. Los ejemplos de secuencias homólogas son secuencias que han sido modificadas en la infraestructura pero no en la parte del anticuerpo de unión con el antígeno de acuerdo con la secuencia ID 1.

- 40 Aún en otra realización la invención se refiere a un agente de unión que se selecciona del grupo de moléculas VHH que se unen a la cadena ligera lambda seleccionadas entre las SEC. ID N°: 16 a 33, o un agente de unión que contiene un dominio variable derivado de una inmunoglobulina, que contiene una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 y/o 3 que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidad de aminoácidos con las
45 CDR de las moléculas VHH de las SEC. ID N°: 16 a 33. Preferentemente, los dominios variables derivados de inmunoglobulinas tienen una afinidad por la cadena ligera lambda de los anticuerpos humanos que es al menos $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$ o $10^8 M^{-1}$. Las CDR 1, 2 y 3 pueden, cada una, exhibir individualmente las identidades definidas antes o las CDR pueden, colectivamente, exhibir las identidades definidas antes.

- 50 Aún en otra realización más, el material inmunoabsorbente contiene al menos dos agentes de unión diferentes cada uno unido a un epítipo inmunológicamente distinto de un dominio Fc de IgG humana, por lo cual los epítipos inmunológicamente distintos del dominio Fc de IgG humana, están separados espacialmente como se define en este documento.

- 55 Todavía en otra realización más, el material inmunoabsorbente contiene al menos dos agentes de unión diferentes cada uno unido a un epítipo inmunológicamente distinto de seroalbúmina humana, por lo cual los epítipos inmunológicamente distintos de la albúmina, están separados espacialmente como se define en este documento.

- 60 En otra realización la invención actual proporciona métodos y materiales inmunoabsorbentes que son muy adecuados para la adsorción o el aislamiento y/o la purificación de inmunoglobulinas de preparaciones crudas, en particular de las inmunoglobulinas humanas de los tipos IgM, IgA, IgE y, más en particular de los isotipos IgG.

- 65 Los materiales inmunoabsorbentes contienen como agentes de unión a la inmunoglobulina cadenas pesadas naturalmente desprovistas de una cadena ligera, preferentemente de VHH de camélidos, que son específicas para un epítipo que está presente al menos dos veces en la inmunoglobulina diana, los cuales pueden ser dianas idénticas o diferentes.

En una realización preferida, la diana puede contener un epítipo presente en una cadena ligera de los isotipos kappa o lambda, donde dichas dianas están siempre presentes por duplicado en una inmunoglobulina intacta.

5 En otra realización puede ser un epítipo que está presente dos veces en la parte Fc de la inmunoglobulina o dos epítipos distintos que están presentes en la parte Fc y simultáneamente accesibles para la interacción con la molécula de unión VHH.

10 Aún en otra realización, los materiales inmunoabsorbentes pueden contener combinaciones de anticuerpos de unión a kappa o lambda con anticuerpos de unión a Fc, preferentemente anticuerpos VHH de camélidos, normalmente desprovistos de una cadena ligera.

15 El uso de agentes de unión a inmunoglobulina específicos para epítipos presentes al menos dos veces en la inmunoglobulina diana resulta en una sorprendente disminución en la velocidad de disociación de 10 veces a más de 1000 veces en algunos casos, como se demuestra en la sección de los ejemplos para anticuerpos de unión a kappa. La disminución en la velocidad de disociación es útil para procesos de aislamiento y purificación, porque la capacidad de unión dinámica de los materiales inmunoabsorbentes (o la velocidad de retención) aumenta extraordinariamente por la menor disociación. En segundo lugar, las inmunoglobulinas todavía se pueden eluir en condiciones suaves, lo que es crucial para conservar su integridad estructural y las propiedades de unión al antígeno.

20 En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "contener", "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitante para dar a entender que los elementos a continuación de las palabras están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por lo tanto, generalmente significa "al menos uno".

La invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

30 Descripción de las figuras

Figura 1. Alineamiento de fragmentos VHH que se unen a las cadenas ligeras kappa humana y lambda humana y consenso para las regiones CDR .

35 Figura 2. Sensorgramas de medidas de afinidad Biacore; curvas de unión de Fab e IgG en Biacore en un chip sensor recubierto de VHH Hu-kappa-1 (A; unión y disociación, B; sólo disociación, que indica el efecto sobre la velocidad de disociación (k disoc.) inducida por la aidez.

40 Figura 3. Secuencias de aminoácidos de CDR de moléculas VHH que se unen a la cadena ligera kappa humana .

Figura 4. Secuencias de aminoácidos de CDR de moléculas VHH que se unen a la cadena ligera lambda humana .

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Generación de ligandos VHH de llama contra las cadenas ligeras kappa de anticuerpos humanos.

El protocolo siguiente se toma como un ejemplo de como fragmentos VHH específicos se pueden aislar, clonar, expresar y después acoplar en la matriz deseada.

50 Aunque los fragmentos VHH particulares descritos en este ejemplo se derivaron de un repertorio inmune, también podrían haber sido seleccionados de una genoteca de VHH no inmunizada (véase EP1051493, Unilever) o una genoteca de VHH sintética/semisintética no inmunizada (véase WO00/43507, Unilever).

55 Se inmunizó una llama con IgM policlonal preparada a partir de suero humano por técnicas de precipitación y filtración en gel y diluida en solución salina amortiguada con fosfato pH 7.4 (PBS). Para aumentar la especificidad de la respuesta inmunitaria, la llama recibió refuerzos varias veces después de la inmunización inicial (días 0, 28 y 49) con 250 µg del antígeno mencionado en specol (ID-DLO, Lelystad, Los Países Bajos) (Boersma et al., 1992). Se tomó una muestra de sangre heparinizada de aproximadamente 150 ml 6 días después de la última inmunización. Se obtuvieron células sanguíneas periféricas mediante una centrifugación con Ficoll-Paque. Se aisló el ARN total de aproximadamente 2×10^8 linfocitos, esencialmente como describen Chomczynski y Sacchi (1987). El ADN que codifica fragmentos VHH específicos se puede aislar después utilizando métodos similares a los descritos en WO 94/04678 (Casterman et al) y ligar por ejemplo en un vector de expresión episómico de *Saccharomyces cerevisiae* según describieron previamente Frenken et al. (2000). De esas genotecas de expresión de VHH, se pueden seleccionar fragmentos VHH con la especificidad de unión al antígeno deseada (cadenas ligeras kappa o lambda de anticuerpos humanos) mediante cribado directo de los sobrenadantes de cultivos de colonias individuales en *S. cerevisiae* (Frenken et al. 2000).

Alternativamente se pueden usar métodos de selección basados en técnicas como expresión en fago y expresión en levadura para aislar VHH anti-cadena ligera kappa que produce clones de repertorios inmunes.

- 5 Para la detección se recubrieron placas de unión Nunc Maxisorp con antígenos para anticuerpos humanos y posteriormente se bloquearon con 4% (p/v) de leche en polvo en PBS. Los fragmentos VHH se detectaron mediante mAb anti-His de ratón en combinación con un anticuerpo policlonal anti-ratón conjugado con HRP en cabra (Bio-Rad, 172-1011) o un suero policlonal anti-VHH de llama en conejo en combinación con anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con HPO en cerdo (Dako, P217). La detección inicial se llevó a cabo en placas Maxisorp recubiertas con un anticuerpo monoclonal humano IgG1 que poseía una cadena ligera kappa o un mAb humano
- 10 IgG1 que poseía una cadena ligera lambda. Los fragmentos VHH de llama que demostraron unirse únicamente a IgG1 kappa se probaron además en ELISA con diferentes anticuerpos monoclonales humanos (p. ej. (IgG, IgA, IgM) para confirmar la especificidad de unión hacia la cadena ligera kappa humana. Durante el proceso de detección, se pudieron identificar fragmentos VHH adicionales que demostraron especificidad de unión hacia la cadena ligera lambda humana. La especificidad de unión de uno de los fragmentos VHH anti kappa humana (VHH Hu-kappa-1) determinada por ELISA se presenta en la tabla 1 y en este documento se compara con otros dos fragmentos VHH que se unen específicamente a la porción Fc de los anticuerpos humanos IgG (los VHH Hu-Fc-1 y Hu-Fc-2, respectivamente). Estos fragmentos VHH se obtuvieron de una genoteca de VHH inmune que se origina de una llama inmunizada con fragmentos Fc humanos preparados a partir de IgG policlonal de suero humano. Como se demuestra en la tabla 1, VHH Hu-kappa-1 reconoce un epítipo que está presente en las cadenas ligeras kappa de anticuerpos humanos y por lo tanto se une a un epítipo que está presente dos veces en la molécula diana en el caso p. ej. de los anticuerpos IgG, IgA e IgE o diez veces en el caso de los anticuerpos IgM. Los fragmentos VHH tanto Hu-Fc-1 como Hu-Fc-2 demuestran ser específicos para un epítipo que está presente en el dominio Fc de las 4 subclases de IgG humanas, donde dicho epítipo está presente una sola vez en la molécula de IgG diana.
- 20
- 25 La secuencia de estos anticuerpos se presenta en las secuencias ID N° 1 a 15 para los VHH que se unen a la cadena ligera kappa y N° 16 a 31 para los VHH que se unen a lambda. La secuencia consenso para los que se unen a kappa y lambda se muestra en la figura 1.

30 Tabla 1 Especificidad de unión de los fragmentos VHH anti-cadena ligera kappa humana y anti-Fc de IgG humana determinada por ELISA.

Anticuerpo:		Fragmento VHH:		
Especie	Isotipo/subclase	Hu-kappa	Hu-Fc-1	Hu-Fc-2
Humana	IgG ₁ lambda	-	+	+
	IgG ₂ lambda	-	+	+
	IgG ₃ lambda	-	+	+
	IgG ₄ lambda	-	+	+
	IgG ₁ kappa	+	+	+
	IgG ₂ kappa	+	+	+
	IgG ₃ kappa	+	+	+
	IgG ₄ kappa	+	+	+
	IgG, fragmentos Fab	+	-	-
	IgG, fragmentos Fc	-	+	+
	IgM (policlonal)	+	-	-
	IgA (policlonal)	+	-	-
Bovina	IgG (policlonal)	-	-	-
Murina	IgG (policlonal)	-	-	-

Producción de anticuerpos y purificación por cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado (IMAC)

- 35 Se produjeron fragmentos VHH de anticuerpos en una escala de fermentación de 1 litro o 10 litros (matraces agitados) utilizando una cepa genéticamente modificada de *Saccharomyces cerevisiae* y se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en sefarsa SP de flujo rápido (Amersham Biosciences). Los anticuerpos purificados se dializaron contra tres cambios de solución amortiguadora PBS, pH 7.4 o la solución amortiguadora de acoplamiento necesaria, 48 horas a 4 °C, utilizando tubería de corte de 3.5 kDa (Spectra/Por 3; Spectrum Medical Industries). Se determinaron las concentraciones de las muestras purificadas por DO₂₈₀. Todas las muestras purificadas se almacenaron a -20 °C cuando no estaban en uso.
- 40

Ejemplo 2: Mediciones de afinidad

Se determinaron las constantes de afinidad de unión de los fragmentos VHH Hu-kappa-1, Hu-Fc-1 y Hu-Fc-2 usando análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un BiaCore 3000. Con este fin, los fragmentos VHH purificados se inmovilizaron en la superficie de un chip sensor CM5 y posteriormente se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos Fab humanos y/o anticuerpos IgG humanos en solución amortiguadora de HBS-EP (HEPES 0.01 M, pH 7.4; NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM; tensioactivo P20 al 0.005%). Se permitió la unión durante 3 minutos a 30 μ l/min, seguida de un paso de disociación de 15 minutos a 30 μ l/min. Las curvas de unión se ajustaron según un modelo de unión de Langmuir 1:1 utilizando el software de Biacore. Un resumen de los datos de afinidad calculados se presenta en la tabla 2. En relación con el fragmento anti Hu-kappa-1 el efecto de avidéz se demuestra claramente mediante grandes diferencias en las velocidades de disociación entre las moléculas de Fab- y de IgG. Puesto que el fragmento anti Hu-kappa-1 está inmovilizado en la superficie de un chip sensor, dicha superficie puede interactuar simultáneamente con dos epítomos idénticos presentes en una molécula de IgG. En comparación con la interacción monovalente con los fragmentos Fab humanos, la velocidad de disociación (k disoc.) de IgG es significativamente menor (>1000 veces) lo que resulta en un valor de KD para IgG de aproximadamente 120 fM comparado con 6.3 nM para los fragmentos Fab. El último valor está en el mismo rango que los valores de KD para los dos VHH anti Hu-Fc (6.4 y 2.2 nM para IgG, respectivamente) lo que indica interacciones monovalentes.

Tabla 2 Datos de afinidad Biacore de los VHH anti Hu-kappa-1 y anti Hu-Fc (VHH inmovilizados en un chip sensor).

VHH	Antígeno	k asoc. (1/Ms)	k disoc. (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Avidez
Hu-kappa-1	Hu-Fab	1.24×10^5	7.78×10^{-4}	1.60×10^8	6.27×10^{-9}	No
Hu-kappa-1	Hu-IgG	4.18×10^5	5.29×10^{-8}	7.90×10^{12}	1.27×10^{-13}	Sí
Hu-Fc-1	Hu-IgG	2.15×10^5	1.39×10^{-3}	1.55×10^6	6.44×10^{-9}	No
Hu-Fc-2	Hu-IgG	8.30×10^5	1.78×10^{-3}	4.66×10^8	2.15×10^{-9}	No

Este efecto sobre la velocidad de disociación (k disoc.) inducido por la avidéz se ilustra además en la figura 2, que compara las curvas de unión Biacore de Fab e IgG (sensorgramas).

Ejemplo 3: Materiales y métodos generales para acoplar y analizar por cromatografía
Acoplamiento a sefarosa activada con N-hidroxisuccinimida (NHS) 4 de flujo rápido

Después de la purificación, los anticuerpos se dializaron contra solución amortiguadora de acoplamiento de NHS. Esta solución amortiguadora contiene HEPES 0.1 M pH 8.3. Para una eficiencia de acoplamiento óptima la relación recomendada entre los volúmenes de solución de acoplamiento/NHS-sefarosa es 0.5:1. Los anticuerpos tenían concentraciones diferentes, 0.5-15 mg/ml, la relación entre anticuerpo/NHS-sefarosa de los anticuerpos varió entre 1:1 y 10:1. Cuando se inmovilizó una mezcla de 2 ligandos en la matriz se utilizó una relación 1:1 de ligandos. El procedimiento siguiente se utilizó para acoplar los anticuerpos a sefarosa activada con NHS 4 de flujo rápido (General Electric Healthcare). Posteriormente, la matriz se lavó dos veces con solución amortiguadora de acoplamiento de NHS. La NHS-sefarosa se mezcló con la solución de anticuerpo y se dejó durante la noche a 4 °C cabeza arriba o 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación el material del gel se filtró a través de un filtro de vidrio fritado y los grupos no reactivos del material del gel se bloquearon con Tris (0.1 M pH 8.0) 1 hora a temperatura ambiente. El medio acoplado se lavó usando pH bajo y alto alternados (3 x 10 cv PBS pH 2 y 3 x 10 cv PBS pH 7.4). Utilizando la fracción no unida se determinó la eficiencia de acoplamiento. Ésta se determina midiendo el valor de DO_{280} de la solución de acoplamiento antes y después del acoplamiento. También se determinó la eficiencia de acoplamiento mirando el patrón de proteínas en SDS-PAGE de la solución de acoplamiento antes y después del acoplamiento.

Experimentos cromatográficos

Se prepararon columnas de la matriz con el anticuerpo acoplado usando columnas HR 5/5 (GE health). Se utilizó una columna de 400 μ l de volumen. Todos los experimentos cromatográficos se realizaron en un explorador Akta 100. Se utilizó un sistema de dos soluciones amortiguadoras, solución amortiguadora A1 la solución amortiguadora de carga fue PBS pH 7.4, solución amortiguadora B la solución amortiguadora de elución p. ej. PBS con adición de HCl 8 M para obtener pH 2.1 o glicina 0.1 M-HCl a pH 2 o 3. Se utilizaron diferentes programas. La detección de proteínas se realizó en línea monitoreando la señal de DO_{214} y DO_{280} . Se recogieron fracciones con un volumen de 1 ml. Las fracciones se neutralizaron inmediatamente con 20 μ l de Tris (2 M).

Determinación de la capacidad de unión dinámica del anticuerpo acoplado a la matriz

Para determinar la capacidad de unión dinámica la columna se cargó con la molécula diana. Se utilizó una velocidad de flujo de 150 cm/h. Las cantidades de molécula diana en el flujo y en la elución se calcularon por integración del área del pico de flujo y de elución. La capacidad de unión dinámica es el área del pico de elución dividido por el área del pico total (flujo + elución) y esto multiplicado por la cantidad de molécula diana.

Ejemplo 4: Capacidades de unión dinámicas de diferentes matrices de VHH para IgG humana

Los fragmentos VHH (ligandos) Hu-kappa-1, Hu-Fc-1 y Hu-Fc-2 se inmovilizaron en NHS-sefarosa como se describió antes. Las densidades de los ligandos fueron 20 mg de ligando por ml de matriz. La capacidad de unión dinámica se determinó utilizando procedimientos como los descritos antes. La columna se cargó con una cantidad de IgG humana superior a la capacidad de unión dinámica esperada. La elución se llevó a cabo usando soluciones amortiguadoras de glicina 0.1 M con valores de pH entre 2 y 4.

Como se puede ver en la tabla 3, la mayor capacidad de unión dinámica (DBC) para la IgG humana se encuentra para la matriz de Hu-kappa-1 y es casi dos veces mayor comparada con las matrices de Hu-Fc-1 y Hu-Fc-2. Las mediciones de afinidad mostraron que la afinidad de unión (KD) de este anticuerpo por moléculas de IgG humana (que contienen 2 cadenas ligeras kappa idénticas) es de aproximadamente 120 fM. Esto es significativamente mayor que la afinidad de unión real de Hu-kappa-1 por su epítipo presente en las cadenas ligeras kappa según se determina con fragmentos Fab de unión monovalente (6.3 nM). Esta última cifra está más en el rango de ambos fragmentos VHH específicos para Fc humano probados y las composiciones conocidas en general en el estado anterior de la técnica. Esto muestra que el uso de materiales inmunoabsorbentes de acuerdo con la invención conduce a una mayor capacidad de unión en comparación con sistemas que no incluyen la característica de unión polivalente.

Otra característica importante de la invención actual es que aunque los ligandos de unión polivalente conducen a afinidades de unión elevadas por la molécula diana, la liberación de dichas moléculas aún se puede seguir obteniendo en condiciones de elución suaves. Como se demuestra en la tabla 3 el pH de elución óptimo para la matriz de Hu-Fc-2 es menor (pH 2) comparado con el de la matriz de Hu-kappa-1 y Hu-Fc-1 (ambos pH 3). La fuerza de unión del fragmento Hu-Fc-2 por su epítipo en la IgG humana es casi tres veces superior en comparación con Hu-Fc-1 y Hu-kappa-1 (2.2 nM frente a 6.4 nM y 6.3 nM, respectivamente). Aunque la unión polivalente de la matriz de Hu-kappa-1 aumenta la capacidad de unión dinámica para IgG humana en comparación p. ej. con la matriz de Hu-Fc-1, esta característica de avidéz claramente no afecta las condiciones para obtener la liberación eficaz de la IgG unida. Dichas condiciones son comparables a las de los sistemas que no incluyen la característica de unión polivalente (p. ej., matriz de Hu-Fc-1).

Los resultados, como se menciona en este ejemplo, se miden con una altura de lecho baja y un tiempo de residencia corto. Alturas de lecho superiores aumentarán el tiempo de residencia y la capacidad dinámica. La capacidad dinámica de la columna de Hu-kappa-1 descrita con una altura de lecho de 15 cm y una velocidad de flujo de 150 cm/h es de 30 a 40 mg de IgG humana/ml de matriz. Esto es aproximadamente dos veces mayor que la capacidad de los sistemas conocidos que no incluyen la característica de unión polivalente que es específica para la invención actual.

El ejemplo demuestra además que el principio polivalente de la invención actual permite una combinación única de alta capacidad de unión por una parte y condiciones de elución suaves por otra parte.

Tabla 3 Comparación de la capacidad de unión dinámica (DBC) de matrices anti-IgG humana.

Matriz	Densidad del ligando (mg/ml)	DBC (mg de ulgG/ml)	pH de elución que da >90% de liberación de IgG unida	KD para HulgG (M-1)
Hu-kappa-1	20	24	3	1.27×10^{-13}
Hu-Fc-1	20	14	3	6.44×10^{-9}
Hu-Fc-2	20	15	2	2.15×10^{-9}

Ejemplo 5: Capacidades de unión dinámicas de matrices para IgG humana que comprenden VHH que se unen a epítipos distintos presentes en la molécula diana

Este ejemplo demuestra la característica de mayor capacidad de unión inducida por la unión polivalente usando al menos dos ligandos VHH diferentes, donde cada ligando reconoce un epítipo distinto de la molécula diana, en este caso anticuerpos humanos IgG.

Con este fin se usaron dos ligandos anti-Fc de la IgG humana (Hu-Fc-1 y Hu-Fc-2), donde cada ligando se une a un epítipo distinto presente en el dominio Fc de los anticuerpos humanos IgG según lo demostrado por análisis de unión Biacore (véase tabla 4). En este experimento Biacore, se inmovilizaron ligandos anti-Fc de la IgG humana purificados en la superficie de un chip sensor CM5 y posteriormente se incubaron con fragmentos Fc humanos. Este paso de captura de Fc humano fue seguido de incubación con alguno de los ligandos VHH Hu-Fc-1 o Hu-Fc-2. La tabla 4 muestra que el ligando VHH Hu-Fc-2 puede unirse a fragmentos Fc humanos cuando es capturado por el

ligando VHH Hu-Fc-1 inmovilizado y viceversa (51 RU y 181 RU, respectivamente) lo que demuestra que cada ligando se une a un epítipo distinto presente en el dominio Fc de los anticuerpos humanos IgG. No se obtuvieron señales de unión significativas en esta configuración usando pares de ligandos idénticos, lo que indica que cada ligando individual se une a un epítipo en el dominio Fc de los anticuerpos humanos IgG que está presente o disponible sólo una vez.

Tabla 4 Señales de unión de los VHH anti Hu-Fc en fragmentos Fc humanos capturados en Biacore.

Configuración Biacore: VHH inmovilizado	Diana de captura (100 µg/ml)	VHH anti Hu-Fc (100 µg/ml)	Señal de unión (RU)
Hb-Fc-1	Fc humano	Hu-Fc-1	6.0
Hu-Fc-1	Fc humano	Hu-Fc-2	51.0
Hu-Fc-2	Fc humano	Hu-Fc-2	9.6
Hu-Fc-2	Fc humano	Hu-Fc-1	181.9

Esto ilustra además que aunque los anticuerpos IgG comprenden dos cadenas ligeras y pesadas idénticas, los ligandos dirigidos contra anticuerpos pueden reconocer epítipos que están formados por una combinación de cadenas idénticas como las presentes en el dominio Fc de dichos anticuerpos. Otra característica que puede ocurrir es que el ligando se una a una parte de la cadena pesada del dominio Fc de tal manera que evite la unión del otro ligando idéntico debido a impedimento estérico.

A este respecto, los dominios de la cadena ligera de los anticuerpos (por ejemplo anti cadenas ligeras kappa humanas) como se demuestra en el ejemplo 4, han probado ser epítipos ideales para generar ligandos específicos contra para permitir la unión polivalente a un epítipo que esté presente dos veces en el caso de los anticuerpos. Dichos ligandos claramente no son afectados por esta característica de impedimento estérico.

Se construyeron tres lotes diferentes de matrices anti-Fc de la IgG humana (Hu-Fc-1, Hu-Fc-2 y Hu-Fc-1/2) en NHS-sefarosa utilizando métodos como los descritos previamente. Para cada matriz la densidad final del ligando fue de 2 mg de ligando por ml de matriz. La capacidad de unión dinámica se determinó utilizando el procedimiento descrito antes. La columna se cargó con una cantidad de IgG humana superior a la capacidad de unión dinámica esperada. Como se puede ver en la tabla 5, la capacidad de unión dinámica para la matriz mixta Hu-Fc-1/2 es mayor que la de cada matriz individual. La capacidad de unión dinámica para la matriz mixta (2.45 mg IgG humana/ml de matriz) es 1.5 veces mayor que el valor promedio de las matrices individuales (1.65 mg de IgG humana/ml de matriz) que a lo sumo se podría esperar si no se hubiera producido unión polivalente en la matriz mixta. Basado en el principio de unión polivalente de la invención actual estos resultados demuestran que se pueden obtener matrices de elevada capacidad de unión usando combinaciones de diferentes ligandos, donde cada ligando se une a un epítipo distinto presente en la molécula diana.

Tabla 5 Comparación de la capacidad de unión dinámica (DBC) de matrices mixtas anti IgG humana.

Matriz mixta	Densidad del ligando (mg/ml)	DBC (mg de HuIgG/ml)
Hu-Fc-1	2	1.95
Hu-Fc-2	2	1.35
Hu-Fc-1 / Hu-Fc-2	2	2.45

Ejemplo 6: Capacidades de unión dinámicas de matrices para seroalbúmina humana que comprenden VHH que se unen a epítipos distintos presentes en la molécula diana

Este ejemplo demuestra la característica de mayor capacidad de unión inducida por la unión polivalente usando al menos dos ligandos VHH diferentes, donde cada ligando reconoce un epítipo distinto en la molécula diana, en este caso seroalbúmina humana.

Con este fin se usaron tres ligandos VHH específicos anti-seroalbúmina humana (HSA) diferentes (HSA-1, HSA-2 y HSA-3). Estos ligandos VHH se obtuvieron de una genoteca de VHH inmune que se origina de una llama inmunizada con seroalbúmina humana. El análisis de unión Biacore de acuerdo con los métodos descritos previamente reveló que los ligandos HSA-2 y 3 se unen al mismo epítipo presente en HSA, mientras que el ligando HSA-1 se une a un epítipo distinto permitiendo la unión polivalente de HSA cuando el ligando VHH HSA-1 se utiliza en combinación con el ligando VHH HSA-2 o 3.

Se construyeron cinco lotes diferentes de matrices anti HSA (HSA-1, HSA-2, HSA-3, HSA-1/2 y HSA-2/3) en NHS-seferosa usando métodos como los descritos antes. Para cada matriz la densidad final del ligando fue de 2 mg de ligando por ml de matriz. La capacidad de unión dinámica se determinó utilizando el procedimiento descrito antes. La columna se cargó con una cantidad de HSA superior a la capacidad de unión dinámica esperada. Como se puede ver en la tabla 6, la capacidad de unión dinámica para la matriz mixta HSA-1/2 es mayor que la de cada matriz individual y la matriz mixta HSA-1/3. La capacidad de unión dinámica de la matriz mixta HSA-1/2 es 2.14 mg de HSA/ml de matriz, que es aproximadamente 1.5 veces mayor comparada con el valor promedio esperado de 1.48 mg de HSA/ml de matriz si no se hubiera producido unión polivalente en la matriz mixta $((1.72 + 1.23) / 2 = 1.48)$. La capacidad de unión dinámica de HSA para la matriz mixta HSA-2/3 es 0.83 mg de HSA/ml de matriz. Esto concuerda con el valor promedio esperado de 0.85 mg de HSA/ml de matriz, puesto que ambos ligandos se unen al mismo epítipo presente en HSA y por lo tanto no pueden inducir una unión polivalente que conduzca a una mayor capacidad de unión como lo demuestra la invención actual.

Tabla 6 Comparación de la capacidad de unión dinámica (DBC) de matrices mixtas anti HSA.

Matriz mixta	Densidad del ligando (mg/ml)	DBC (mg de HSA/ml)
HSA-1	2	1.72
HSA-2	2	1.23
HSA-3	2	0.46
HSA-1/2	2	2.14
HSA-2/3	2	0.83

References

[0110]

Boersma, W.J.A., Bogaerts, W.J.C., Bianchi, A.T.J., Claassen, E., 1992. Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with specol. Res. Immunol. 143, 503-512.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenolchloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.

Frenken G.J., Richard H.J. van der Linden, Pim W.J.J. Hermans, J. Wil Bos a, Robin C. Ruuls, Bernard de Geus, C. Theo Verrips, 2000, Journal of Biotechnology 78, 11-21.

Listado de secuencias

[0111]

<110> Unilever N.V. / BAC Unilever N.V.

<120> Método para la purificación por afinidad

<130> P6004885 pct / T7116

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Lama glama

ES 2 408 256 T3

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Val Ala Arg Arg Ser Gly Asp Gly Ala Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Asp Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 2

10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Thr Gly Leu Thr Phe Ser Gly Val
20 25 30

Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ile Ile Arg Trp Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Pro Ser Asp Arg Phe Gly Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

15 <211> 121

ES 2 408 256 T3

<212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Val Ala Arg Arg Ser Gly Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Ser Ala
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Asp Ser Ser Thr Asp Tyr Thr Gly Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 4
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Val Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Val Ala Arg Arg Thr Gly Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Ser Ala
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Asp Ser Ser Thr Phe Tyr Thr Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 408 256 T3

<210> 5
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 5

5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Leu Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Val Ala Arg Arg Ser Gly Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Ser Ala
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 -----85-----90-----95
 Ala Ile Asp Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 6

15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Arg Tyr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Arg Val Asp Trp Ser Gly Gly Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

20

<210> 7
 <211> 118

ES 2 408 256 T3

<212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Val Asp
 20 25 30

Ile Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Arg Val
 35 40 45

Gly Ser Met Tyr Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asp Ser Thr Asp Asn Ala Lys Arg
 65 70 75 80

Ile Thr Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Ala Gly Ser Phe Tyr Trp Gly Ser Gly Thr
 100 105 110

5 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 8

10

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Ser Val Ala Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Arg Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Ile Glu Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Thr Lys Ser Thr Ile Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Pro Tyr Gly Leu Gly Arg Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

15 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 408 256 T3

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 9

5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Val Asp
 20 25 30
 Ile Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Arg Val
 35 40 45
 Ala Ser Met Phe Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asp Ser Thr Asp Asn Ala Lys Arg
 65 70 75 80
 Ile Thr Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Ala Gly Ser Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 10

10

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Arg Thr Phe Ser Val Tyr
 20 25 30
 Thr Val Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Gly Lys Glu Arg Glu Phe
 35 40 45
 Val Ala Gln Ile Asn Trp Asn Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Gln Met Ser Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Ala Gly Ser Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 100 105 110

15 Ser

ES 2 408 256 T3

<210> 11
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 11

5

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Thr His
 20 25 30
 Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Trp Asn Gly Ala Val Thr Asn Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Arg Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

10

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 12

15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Arg Arg Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Ala
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Val Ser Asp Asp Asn Thr Gly Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 408 256 T3

<210> 13
 <211> 126
 <212> PRT
 5 <213> Lama glama
 <400> 13

 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ile His
 20 25 30

 Leu Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu
 35 40 45

 Ala Ser Ile Ile Trp Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Gly Thr Thr
 50 55 60

 Phe Tyr Gly Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Asn Asp Asn
 65 70 75 80

 Ala Arg Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 85 90 95

 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ser Leu Val Asn Pro Thr Arg
 100 105 110

 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 10 115 120 125

<210> 14
 <211> 126
 <212> PRT
 15 <213> Lama glama
 <400> 14

ES 2 408 256 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ile His
20 25 30

Leu Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ile Trp Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Gly Thr Thr
50 55 60

Phe Tyr Gly Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Asn Asp Asn
65 70 75 80

Ala Arg Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ser Leu Glu Asn Pro Thr Arg
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

- 5 <210> 15
- <211> 126
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ile His
20 25 30

Leu Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ile Trp Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Gly Thr Thr
50 55 60

Phe Tyr Gly Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Asn Asp Asn
65 70 75 80

Ala Arg Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ser Leu Glu Asn Pro Thr Arg
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

- 10 <210> 16
- <211> 128

ES 2 408 256 T3

<212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

5 Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr
 50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 65 70 75 80

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Leu Phe Gly Val Ala Thr Thr Asp Pro
 100 105 110

Ser Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

10 <210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 17

ES 2 408 256 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Ser Asp Thr Tyr Tyr Glu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Arg His Tyr Gly Leu Cys Val Val Asp Arg Ala Tyr Tyr Ala
100 105 110

Met Gly Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

- 5 <210> 18
- <211> 128
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ser Cys Met Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr
50 55 60

Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
65 70 75 80

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Thr Thr Asp Pro
100 105 110

10 Ser Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

- <210> 19
- <211> 124

<212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr Glu Asp Ser Val
 50 55 60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Arg Leu Phe Gly Val Ala Thr Met Asp Pro Ser Tyr Phe Gly
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 20
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Gly Ile
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Asn Val Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Arg His Tyr Gly Leu Cys Val Val Asp Arg Tyr Tyr Tyr Asp
 100 105 110

15 Met Gly Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

ES 2 408 256 T3

<210> 21
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 21

5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr
 50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 65 70 75 80

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Met Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg His Tyr Gly Leu Cys Val Val Asp Pro
 100 105 110

Asp Tyr Tyr Gly Lys Gly Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Pro Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

10

<210> 22
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 22

15

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asn Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Gly Asn Ser Tyr Thr Tyr Tyr Glu Asp Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

ES 2 408 256 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Arg Leu Phe Gly Val Ala Thr Met Asp Pro Ser Tyr Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Lama glama
<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30

Phe Ala Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gln Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ile Val Thr Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Ala Lys Lys Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Ile Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Gly Asn Phe Gly Thr Ala Leu Thr Asn Leu Ser Ala Trp Gly Gln Gly
100 105 110

10 Thr Gln Val Thr Val Thr Ser
115

<210> 24
<211> 120
<212> PRT
15 <213> Lama glama
<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

ES 2 408 256 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
 20 25 30

Val Ala Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Met Ser Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Asn Val Arg Gln Lys Ser Gly His Asn Ile Ser Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 25
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
 20 25 30

Val Ala Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Met Ser Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80

- 10 Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Ala Asn Val Arg Gln Asn Ser Gly His Asn Ile Ser Ala Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 15 <210> 26
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 26

ES 2 408 256 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30

Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gln Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ile Val Thr Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Ala Lys Lys Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Asn Cys Asp
85 90 95

Ala Asn Ile Asn Ser Arg Val Gly Arg Ile Ser Ala Arg Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 27
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr Glu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
-----85-----90-----95

Ala Ala Ser Leu Phe Gly Val Ala Thr Met Asp Pro Ser Tyr Phe Gly
100 105 110

Ser Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

- 15 <210> 28
- <211> 123

ES 2 408 256 T3

<212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile
 35 40 45

Ser Cys Val Ser Ser Ser Asp Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ala Arg Leu Trp Gly Leu Cys Ala Val Asp Glu Ala Tyr Phe Thr Ser
 100 105 110

5 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 29
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 29

ES 2 408 256 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
20 25 30

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser
35 40 45

Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly His Thr Tyr Ser Val Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Arg Arg Trp Gly Leu Cys Thr Val Asp Val Pro Tyr Phe His Ser
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 128
<212> PRT
<213> Lama glama
<400> 30

5

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Lys Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

10

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ser Asp Gly Trp Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
65 70 75 80

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Leu Phe Gly Val Ala Thr Thr Asp Pro
100 105 110

Ser Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31
<211> 126

15

ES 2 408 256 T3

<212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Gly Ile
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Asn Val Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Arg Gln Tyr Gly Leu Cys Val Val Asp Arg Tyr Tyr Tyr Asp
 100 105 110

5 Met Gly Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 32
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <400> 32

10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Phe
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Glu Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Arg Leu Phe Gly Ile Cys Thr Val Asp Ala Gly Tyr Phe Gly
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 408 256 T3

<210> 33
 <211> 121
 <212> PRT
 5 <213> Lama glama
 <400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Leu Val
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Arg Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Phe Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ile Ile Glu Tyr Ser Gly Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95

Ala Ala Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Ala Tyr Asn Phe Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de una inmunoglobulina, donde:
- 5 a) el método comprende el paso de unir la inmunoglobulina a un material inmunoabsorbente que contiene al menos un agente de unión mono-específico;
- b) el agente de unión tiene afinidad por al menos dos epítopos de la inmunoglobulina que están espacialmente separados por al menos 30 angstrom; y,
- 10 c) el agente de unión mono-específico es un dominio variable de un anticuerpo que se puede obtener de un camélido que comprende sólo cadenas pesadas y que está naturalmente desprovisto de cadenas ligeras.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la avidéz del material inmunoabsorbente por la molécula de inmunoglobulina es al menos 50 veces superior que la menor afinidad de un agente de unión por un epítipo individual.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el material inmunoabsorbente contiene un primer agente de unión con afinidad de unión por un primer epítipo de la inmunoglobulina y un segundo agente de unión con afinidad de unión por un segundo epítipo de la inmunoglobulina y donde el primer y segundo epítopos son epítopos inmunológicamente diferentes.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde los al menos dos epítopos son al menos dos epítopos inmunológicamente idénticos que están repetidos en la inmunoglobulina.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el agente de unión contiene un dominio variable derivado de una inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno completo para un epítipo de la inmunoglobulina en una cadena polipeptídica única y por medio de lo cual las secuencias de aminoácidos de la infraestructura del dominio variable tienen al menos 50% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la infraestructura de cualquiera de las SEC. ID N°: 1 a 33.
- 25 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los al menos dos epítopos están fuera de la CDR de la inmunoglobulina.
- 30 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el al menos un epítipo está presente en la cadena ligera de una inmunoglobulina.
- 35 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde los al menos dos epítopos son epítopos de una inmunoglobulina humana.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, donde los epítopos son epítopos de una cadena ligera de una inmunoglobulina humana del isotipo kappa o lambda.
- 40 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el agente de unión se selecciona del grupo de moléculas VHH que se unen a la cadena ligera kappa seleccionadas entre las SEC. ID N°: 1 a 15, o un agente de unión que contiene un dominio variable derivado de una inmunoglobulina, que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 o 3 que tiene por lo menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidad de aminoácidos con las CDR de las moléculas VHH de las SEC. ID N°: 1 a 15.
- 45 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el agente de unión se selecciona del grupo de moléculas VHH que se unen a la cadena ligera kappa seleccionadas entre las SEC. ID N°: 16 a 33, o un agente de unión que contiene un dominio variable derivado de una inmunoglobulina, que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 o 3 que tiene por lo menos 80, 85, 90, 95, 98% de identidad de aminoácidos con las CDR de las moléculas VHH de las SEC. ID N°: 16 a 33.
- 50 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los al menos dos epítopos son al menos dos epítopos inmunológicamente distintos de un dominio Fc de la IgG humana.

Figura 1

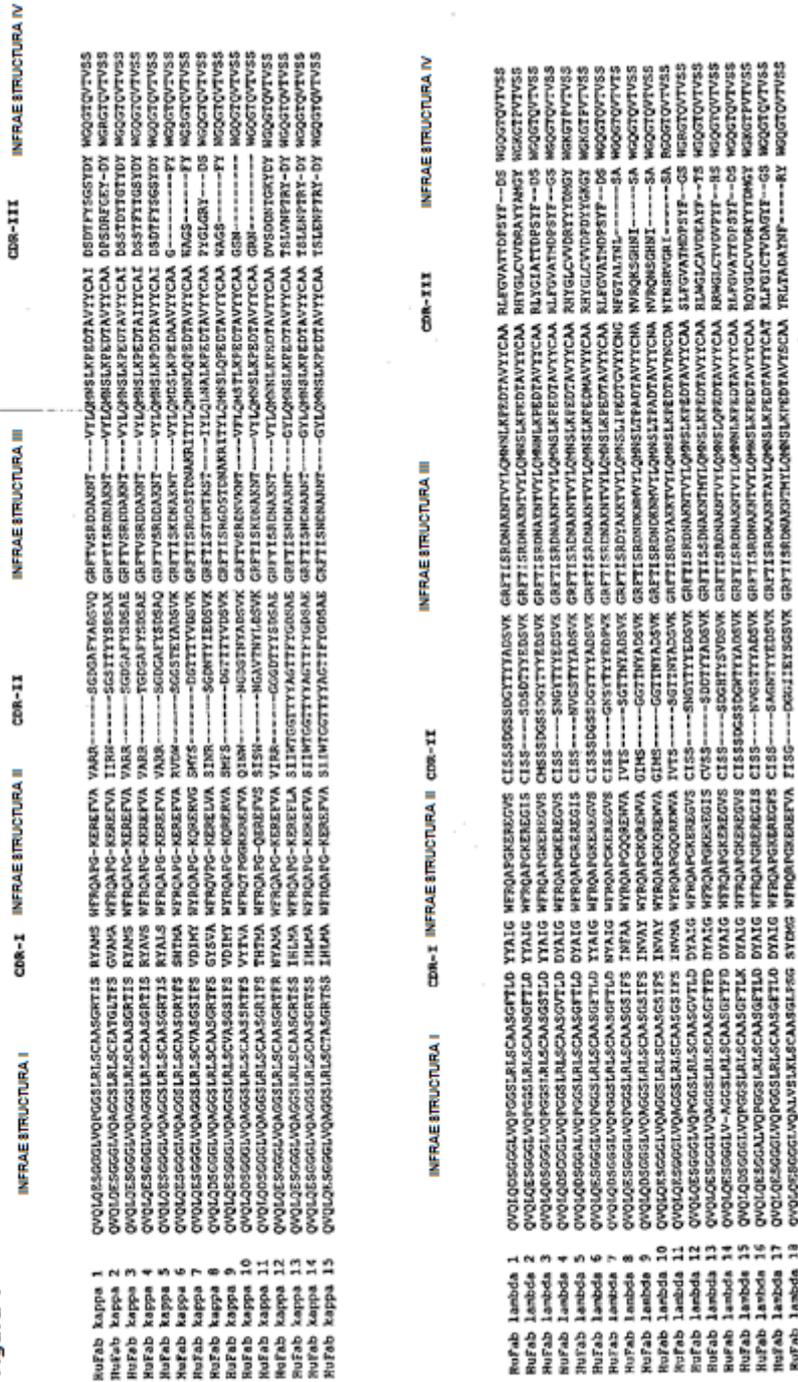


Figura 2

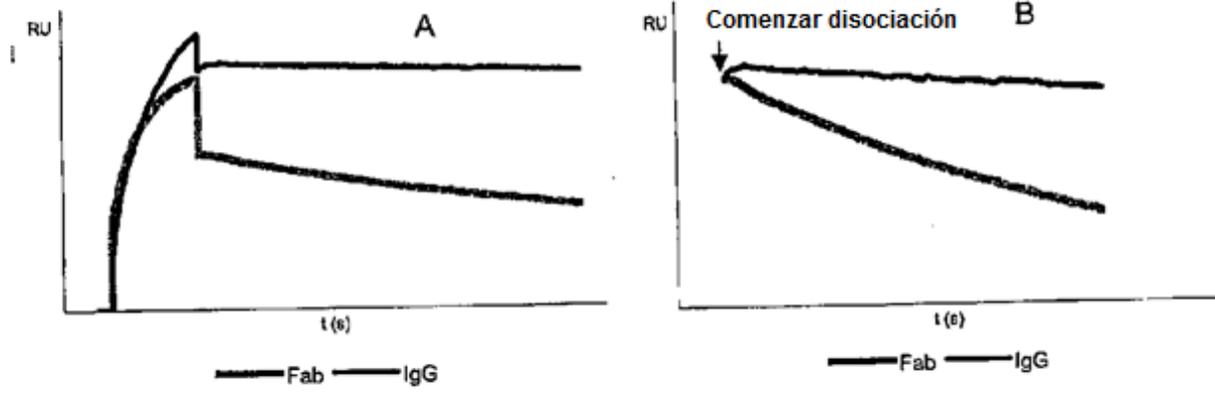


Figura 3 Resultados del alineamiento μ -kappa VHs, CDR1,2 y 3

Alineamiento: Alineamiento de proteína global contra molécula de referencia

Parámetros: Matriz de puntuación: BLOSUM 62

Grupo I	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de aparea miento
Hu-kappa-1	RYAMS	VARRSGDAE-YADSVQD	SDTFYSGSY--DY	1	33	33	0	100
Hu-kappa-5	RYALS	VARRSGDAE-YSDSAQD	SDTFYSGSY--DY	1	33	30	3	90
Hu-kappa-4	RYAVS	VARRTGDAE-YSDSAED	SSTFYTGSY--DY	1	33	26	7	78
Hu-kappa-3	RYAMS	VARRSGDAE-YSDSAED	SSTDYTGTY--DY	1	33	26	7	78
Hu-kappa-2	GVAMA	LIRWSSGTTY-YSDSAKD	PSDRFGEY---DY	1	32	16	18	47
Hu-kappa-12	NYAMA	VIRRGGGDTY-YSDSAED	VSDNTGKY--DY	1	33	15	18	45
Grupo II	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de aparea miento
Hu-kappa-10	VYTVA	QINWNGDSTN-YADSVKQ	-----SN	1	24	24	0	100
Hu-kappa-11	THTMA	SISWNGAVTN-YLDSVKQ	-----RN	1	24	15	9	62
Hu-kappa-6	SHTMA	RVDWGGSTE-YADSVKQ	-----PY	1	24	13	11	54
Hu-kappa-8	GYSVA	SINRSQDNTY-IEDSVKP	YGLGRY-----DS	1	30	12	18	40
Grupo III	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de aparea miento
Hu-kappa-13	IHLMA	SIITWGGTTY-YAGTTFY	GDSAETSLENPTRYDY	1	38	38	0	100
Hu-kappa-14	IHLMA	SIITWGGTTY-YAGTTFY	GDSAETSLENPTRYDY	1	38	37	1	97
Hu-kappa-15	IHLMA	SIITWGGTTY-YAGTTFY	GDSAETSLENPTRYDY	1	38	37	1	97
Grupo IV	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de aparea miento
Hu-kappa-7	VDIMY	SMYSDGTTT--YVDSVKW	AGS-----FY	1	26	26	0	100
Hu-kappa-9	VDIMY	SMFSDGTTT--YVDSVKW	AGS-----FY	1	26	25	1	96

Figura 4: Resultados del alineamiento Hu-Lambda VHhs, CDR1,2 y 3
 Alineamiento: Alineamiento de proteína global contra molécula de referencia
 Parámetros: Matriz de puntuación: BLOSUM 62

Grupo I	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de apareamiento
Hu-lambda-1	YYAIG	CISSSDGSDDGYTYADSVK	RLFGVATDPSYF---DS	1	40			100
Hu-lambda-15	DYAIG	CISSSDGSDDGYTYADSVK	RLFGVATDPSYF---DS	1	40	38	2	95
Hu-lambda-3	YYAIG	CMSSSDGSDDGYTYEDSVK	RLYGIATDPSYF---DS	1	40	36	4	90
Hu-lambda-4	DYAIG	CISS-----SNGYTYEDSVK	RLFGVATDPSYF---GS	1	36	31	9	77
Hu-lambda-12	DYAIG	CISS-----SNGYTYEDSVK	SLEGVATDPSYF---GS	1	36	30	10	75
Hu-lambda-7	NYAIG	CISS-----GNSYTYEDPVK	RLFGVATDPSYF---DS	1	36	29	11	72
Hu-lambda-6	YYAIG	CISSSDGSDDGYTYADSVK	RHYGLCVVDPYIGK-GY	1	42	30	12	71
Hu-lambda-17	DYAIG	CISS-----SAGNTYYEDSVK	RHFGICTVDAGYF---GS	36	26	14		65
Hu-lambda-13	DYAIG	CVSS-----SDDTYADSVK	RLWGLCAVDEAYF---TS	1	35	24	16	60
Hu-lambda-14	DYAIG	CISS-----SDGHTYVDSVK	RRWGLCTVDVPYF---HS	1	36	24	16	60
Hu-lambda-2	YYAIG	CISS-----SDSPTYEDSVK	RHYGLCVVDRAYYM-GY	1	38	24	18	57
Hu-lambda-16	DYAIG	CISS-----NVGSTYYADSVK	RQYGLCVVDRYYIDM-GY	1	38	23	19	54
Hu-lambda-5	DYAIG	CISS-----NVGSTYYADSVK	ARHYGLCVVDRYYIDMGY	1	39	23	20	53
Grupo II	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de apareamiento
Hu-lambda-8	INFAA	IVTS-----SGTINYADSVK	NFGTALNL-----SA	1	31			100
Hu-lambda-11	INVMA	IVTS-----SGTINYADSVK	NINRVGRI-----SA	1	31	21	10	67
Hu-lambda-9	INVAY	GIMS-----GGTINYADSVK	NVRQKSGHNI-----SA	1	32	18	14	56
Hu-lambda-10	INVAY	GIMS-----GGTINYADSVK	NVRQNSGHNI-----SA	1	32	18	14	56
Grupo II	CDR-1	CDR-2	CDR-3	Inicio	Fin	Aparea miento	No aparea miento	% de apareamiento
Hu-lambda-18	SYDMG	FISG-----DGGITEYSGSVK	YRLTADAYNE-----RY	1	33			