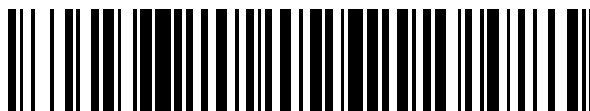


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 166**

51 Int. Cl.:

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2009 E 12163615 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2495254**

54 Título: **Nuevas proteínas de unión a inmunoglobulina con especificidad mejorada**

30 Prioridad:

11.08.2008 US 188549 P

16.04.2009 US 212812 P

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

12.05.2017

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US

72 Inventor/es:

SPECTOR, SHARI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 612 166 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

Nuevas proteínas de unión a inmunoglobulina con especificidad mejorada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a proteínas de unión a inmunoglobulina modificadas, por ejemplo, la proteína A de *Staphylococcus*, que tiene una especificidad de unión mejorada para inmunoglobulinas y a métodos de fabricación y uso de las mismas.

Antecedentes

10 La proteína estafilocócica A (SpA), es una proteína de múltiples dominios de 42 kDa de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La 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, 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 et al., J Biol Chem. Feb 10;259(3):1695-702 (1984)). Cada uno de esos dominios contiene aproximadamente 58 restos de aminoácidos, y comparten un 65-90 % de identidad de secuencia de aminoácidos. El dominio Z de SpA es un análogo modificado del dominio B de SpA e incluye una alanina en lugar de un resto de glicina en la posición 29.

15 Los reactivos basados en SpA han encontrado un uso generalizado en el campo de la biotecnología, por ejemplo, en cromatografía de afinidad para la captura y purificación de anticuerpos, así como en métodos de detección de anticuerpos. En la actualidad, los medios de afinidad basados en SpA son probablemente los medios de afinidad más ampliamente utilizados para el aislamiento de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos procedentes de diferentes muestras, incluyendo de cultivo celular. De acuerdo con esto, están disponibles comercialmente diversas matrices que comprenden ligandos de proteína A que incluyen, por ejemplo, ProSep®-vA de alta Capacidad, ProSep® vA Ultra y ProSep® UltraPlus (Millipore) y Protein A Sepharose™, MabSelect™, MabSelect Xtra™ y MabSelect SuRe® (GE Healthcare).

20

El documento WO 00/69457 desvela dominios de unión basados en Proteína A con actividades deseables.

Compendio de la invención

25 La presente invención proporciona, al menos en parte, variantes de SpA nuevas y mejoradas que muestran unión reducida o aumentada a una porción Fab de una inmunoglobulina en comparación con las variantes de SpA conocidas anteriormente, a la vez que retienen la capacidad para unirse a la porción Fc de la inmunoglobulina.

30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona variantes de SpA nuevas y mejoradas que muestran una unión a Fab reducida en comparación con los muchos reactivos basados en proteína A disponibles comercialmente que se unen Fab, una propiedad que a veces no es deseable.

Según la presente invención se proporciona un dominio de unión a inmunoglobulina según la presente invención basado en el dominio Z de SpA que está modificado para reemplazar al menos un aminoácido en la posición 29. En el caso del dominio Z, el aminoácido en la posición 29 es una alanina, que está reemplazada por leucina, lisina o arginina.

35 Se proporciona una proteína aislada de unión a inmunoglobulina, que comprende al menos un dominio Z de SpA, en la que al menos el resto de alanina en la posición 29 se reemplaza por una lisina, arginina o leucina donde la proteína de unión a inmunoglobulina presenta unión a una porción Fc de una inmunoglobulina pero muestra una unión reducida a una porción Fab de la inmunoglobulina en relación a una proteína de unión a inmunoglobulina que incluya alanina o glicina en la posición 29.

40 Una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención puede incluir además más de un dominio SpA modificado o variantes conocidas del mismo (por ejemplo, más de uno de E, D, A, B, C y/o Z y cualquier combinación de los mismos) donde cada dominio comprende la glicina (*es decir*, en el caso de los dominios E, D, A, B y C) o alanina (*es decir*, en el caso del dominio Z) en la posición 29 reemplazada por otro aminoácido, *por ejemplo*, un aminoácido distinto de alanina, glicina o triptófano. En este caso, la glicina o alanina en la posición 29 puede reemplazarse particularmente por un aminoácido distinto de alanina, glicina, triptófano y treonina.

45

50 La glicina (G) en la posición 29 en uno o más de los dominios E, D, A, B y C aísla dos o la alanina en la posición 29 en el dominio Z aislado puede reemplazarse por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina (L), lisina (K), asparagina (N), valina (V), isoleucina (I), serina (S), cisteína (C), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y), ácido glutámico (E), glutamina (Q), histidina (H), prolina (P), arginina (R), ácido aspártico (D) o una variante funcional o derivado de la misma.

Una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención puede incluir además un dominio C y opcionalmente uno o más dominios E, D, A, B, C o Z aislados, donde el uno o más dominios aislados comprenden el resto de glicina en la posición 29 (*por ejemplo*, en el caso de los dominios E, D, A, B y C) o la alanina en la posición

29 (por ejemplo, en el caso del dominio Z) puede reemplazarse por un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, lisina y arginina o una variante funcional o derivado de la misma.

La proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede incluir además al menos una porción de la región carboxi-terminal de SpA (denominada el dominio X).

- 5 Una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención puede comprender además una asparagina, *por ejemplo*, en la posición 23, sustituida por otro aminoácido.

Las inmunoglobulinas que son capaces de unirse a las diversas proteínas de unión a inmunoglobulina descritas en la presente memoria incluyen una o más de IgG, IgA e IgM.

- 10 La invención incluye y proporciona una matriz de cromatografía útil para el aislamiento de inmunoglobulinas o anticuerpos. En una realización, una matriz de cromatografía de acuerdo con la presente invención comprende una proteína aislada de unión a inmunoglobulina, como se describe en la presente memoria, acoplada a un soporte sólido.

- 15 También se proporcionan en la presente memoria moléculas de ácido nucleico que codifican las diversas proteínas de unión a inmunoglobulina descritas en el presente documento, así como células hospedadoras que incluyen dichas moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones, una célula hospedadora es una célula procarionta. En otras realizaciones, una célula hospedadora es una célula eucariota.

- 20 También se proporcionan en la presente memoria métodos de uso de las proteínas de unión a inmunoglobulina descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona un método de purificación por afinidad de una o más inmunoglobulinas de una muestra, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende una o más inmunoglobulinas; (b) poner en contacto la muestra con una matriz de cromatografía que comprende una proteína de unión a inmunoglobulina, como se describe en la presente memoria, en condiciones tales que una o más inmunoglobulinas se unen a la matriz; y recuperar la una o más inmunoglobulinas unidas por elución a un pH adecuado.

- 25 En varias realizaciones descritas la presente memoria, el pH adecuado en el que se eluyen una o más inmunoglobulinas unidas es un pH ácido.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La FIG. 1 representa las secuencias de ácido nucleico para los dominios de unión a IgG de tipo silvestre (ts) de SpA, representados por las SEQ ID NO: 1-5. La SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de ácido nucleico para el dominio E de ts; la SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de ácido nucleico para el dominio D de ts; la SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de ácido nucleico para el dominio A de ts; la SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de ácido nucleico para el dominio B de ts; y la SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de ácido nucleico para el dominio C de ts.

La FIG. 2 representa la secuencia de ácido nucleico para el dominio Z de SpA representado por la SEQ ID NO: 6.

- 35 La FIG. 3 representa los alineamientos de secuencia de aminoácidos de los dominios de unión a IgG de tipo silvestre (ts) de SpA (E, D, A, B y C) que incluyen una glicina en la posición 29. La SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos para el dominio E de ts; la SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos para el dominio D de ts; la SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de aminoácidos para el dominio A de ts; la SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos para el dominio B de ts; y la SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos para el dominio C de ts.

- 40 La FIG. 4 representa la secuencia de aminoácidos para el dominio Z de SpA, representado por la SEQ ID NO: 12.

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

- 45 La FIG. 6 representa las secuencias de ácido nucleico para tres mutantes de dominio SpA B, en los que la glicina en la posición 29 se ha reemplazado por leucina, lisina o arginina. La SEQ ID NO: 13 representa la secuencia de ácido nucleico para el mutante G29L de SpA; la SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de ácido nucleico para el mutante G29K de SpA; y la SEQ ID NO: 15 representa la secuencia de ácido nucleico para el mutante G29R de SpA.

- 50 La FIG. 7 representa las secuencias de aminoácidos para tres mutantes de dominio B de SpA, en los que la glicina en la posición 29 se ha reemplazado por leucina, lisina o arginina. La SEQ ID NO: 16 representa la secuencia de ácido nucleico para el mutante G29L del dominio B de SpA; la SEQ ID NO: 17 representa la secuencia de ácido nucleico para el mutante G29K del dominio B de SpA; y la SEQ ID NO: 18 representa la secuencia de ácido nucleico para el mutante G29R del dominio B de SpA.

La FIG. 8 representa un ejemplo de experimento de transferencia de Western en el que se detectó la expresión de la proteína A a partir del vector PET11a: 8620 en células E. coli BL21 (DE3) usando un anticuerpo IgY de pollo anti-proteína A.

La FIG. 9 muestra los resultados de un experimento representativo que evalúa la unión de las porciones Fc y F(ab)₂ de una inmunoglobulina a la resina de níquel sola (control negativo) o al medio de cromatografía MabSelect SuRe® (control positivo), seguida de análisis por SDS-PAGE, que se muestra. E representa el eluato o la fracción unida después de la cromatografía y S representa el sobrenadante o la fracción no unida después de la cromatografía. De izquierda a derecha: el carril 1 representa un marcador de peso molecular; los carriles 2-5 representan la unión de F(ab)₂ (carriles 2(E), 3(S)) o de Fc (carriles 4(E), 5(S)) a la resina de níquel; los carriles 6-9 representan la unión de F(ab)₂ (carriles 6(S), 7(E)) o de Fc (carriles 8(S), 9(E)) al MabSelect SuRe®; y los carriles 10 y 11 representan el F(ab)₂ y el Fc solos. El F(ab)₂ corre en una SDS-PAGE como un doblete de aproximadamente 18 y 20 kDa y Fc corre en una SDS-PAGE de aproximadamente 22 kDa. Como se muestra en los carriles 2(E) y 4(E) respectivamente, tanto F(ab)₂ como Fc presentan una unión de débil a nula a la resina de níquel (control negativo). Asimismo, como se muestra en el carril 7(E), F(ab)₂ muestra unión al MabSelect SuRe®, mientras que Fc muestra una unión significativa al MabSelect SuRe® (control positivo).

La FIG. 10 representa los resultados de un experimento representativo que evalúa la unión de las porciones F(ab)₂ y Fc de una inmunoglobulina a SpA de tipo silvestre marcada con His (SpA_{ts}) o a variante de dominio B marcada con His que incluye una alanina en lugar de glicina en la posición 29 (G29A) usando cromatografía de afinidad de níquel seguida de análisis SDS-PAGE, que se muestra. F representa un suministro de proteína A; FT representa el flujo pasante de proteína A; S representa el sobrenadante tras la etapa de unión a Fc o Fab (fracción no unida); y E representa la fracción de elución (fracción unida). De izquierda a derecha: el carril 1 representa un marcador de peso molecular; el carril 2 representa la fracción F del experimento que evalúa la unión de SpA_{ts} a F(ab)₂ o a Fc; los carriles 3-5 representan la unión de SpA_{ts} a F(ab)₂ en las fracciones FT (carril 3), S (carril 4) y E (carril 5); los carriles 6-8 representan la unión de SpA_{ts} a Fc en las fracciones FT (carril 6), S (carril 7) y E (carril 8); el carril 9 representa la fracción F del experimento que evalúa la unión de G29A a F(ab)₂ o a Fc; los carriles 10-12 representan la unión de G29A a F(ab)₂ en las fracciones FT (carril 10), S (carril 11) y E (carril 12); y los carriles 13-15 representan la unión de G29A a Fc en las fracciones FT (carril 13), S (carril 14) y E (carril 15).

La FIG. 11 representa los resultados de un experimento representativo que evalúa la unión de las porciones F(ab)₂ y Fc de una inmunoglobulina a una variante de dominio B marcada con His que incluye una leucina en lugar de glicina en la posición 29 (G29L) usando cromatografía de afinidad de níquel seguida de análisis SDS-PAGE, que se muestra. F representa un suministro de proteína A; FT representa el flujo pasante de proteína A; S representa el sobrenadante tras la etapa de unión a Fc o a F(ab)₂ (fracción no unida); y E representa la fracción de elución (fracción unida). De izquierda a derecha: el carril 1 representa un marcador de peso molecular; el carril 2 representa la fracción F; los carriles 3-5 representan la unión de F(ab)₂ a G29L en las fracciones FT (carril 3), S (carril 4) o E (carril 5); y los carriles 6-8 representan la unión de Fc a G29L en las fracciones FT (carril 6), S (carril 7) y E (carril 8).

La FIG. 12 representa los resultados de un experimento representativo que evalúa la unión de las porciones F(ab)₂ y Fc de una inmunoglobulina a una variante de dominio B marcada con His que incluye una lisina en lugar de glicina en la posición 29 (G29K) y a una variante de dominio B marcada con His que incluye una arginina en lugar de glicina en la posición 29 (G29R) usando cromatografía de afinidad de níquel seguida de análisis SDS-PAGE, que se muestra. F representa un suministro de proteína A; FT representa el flujo pasante de proteína A; S representa el sobrenadante tras la etapa de unión a Fc o a F(ab)₂ (fracción no unida); y E representa la fracción de elución (fracción unida). De izquierda a derecha: el carril 1 representa un marcador de peso molecular; El carril 2 representa la fracción F del experimento que evalúa la unión de G29K a F(ab)₂ y a Fc; los carriles 3-5 representan la unión de F(ab)₂ a G29K en las fracciones FT (carril 3), S (carril 4) o E (carril 5); los carriles 6-8 representan la unión de Fc a G29K en las fracciones FT (carril 6), S (carril 7) y E (carril 8); El carril 9 representa la fracción F del experimento que evalúa la unión de G29R a F(ab)₂ y a Fc; los carriles 10-12 representan la unión de F(ab)₂ a G29R en las fracciones FT (carril 10), S (carril 11) o E (carril 12); y los carriles 13-15 representan la unión de Fc a G29R en las fracciones FT (carril 13), S (carril 14) y E (carril 15).

Las FIG. 13A-13E representan los resultados de un experimento representativo que evalúa adicionalmente la unión de variantes de SpA de la invención a una porción Fc de una inmunoglobulina usando análisis de resonancia de plasmón superficial. Las figuras representan la unión de Fc a concentraciones que varían de 45 nM - 185 pM a los controles de proteína A de tipo silvestre (FIG. 13A) y G29A (FIG. 13B) y a las construcciones G29K (FIG. 13C), G29R (FIG. 13D) y G29L (FIG. 13E)

Las FIG. 14A-14E representan los resultados de un experimento representativo que evalúa adicionalmente la unión de variantes de SpA de la invención a una porción F(ab)₂ de una inmunoglobulina usando análisis de resonancia de plasmón superficial. Las figuras representan la unión de F(ab)₂ a concentraciones en el intervalo de 45 nM - 185 pM a las diversas construcciones de proteína A. Se observa unión fuerte para la proteína A de tipo silvestre (FIG. 14A), y se observa unión débil para el control G29A (FIG. 14B). No se detectó unión para G29K (FIG. 14C), G29R (FIG. 14D) y G29L (FIG. 14E).

Las FIGs 15A-15B representan los resultados de experimentos de pulso con Fc y Fab representativos para resinas de cromatografía de SpA. En la figura 15A, la fracción no unida de Fc aparece en 7 volúmenes de columna (VC) y el Fc unido eluye en 23 VC. En la figura 15B, la fracción no unida de F(ab)₂ aparece en 7 VC y el Fc unido eluye en entre 23-25 VC.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona, al menos en parte, variantes del dominio Z de SpA que se unen a una porción Fab de una inmunoglobulina con una afinidad menor que la SpA de tipo silvestre y variantes de SpA descritas anteriormente, conservando al mismo tiempo la capacidad de unirse a la porción Fc de una inmunoglobulina.

5 I. Definiciones

Con el fin de que la presente divulgación se pueda entender más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "proteína de unión a inmunoglobulina" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos de "SpA" o de "proteína A de *Staphylococcus aureus*", que comprende uno o más dominios de SpA modificados (por ejemplo, uno o más de E, D, A, B, C o Z modificados) que presentan una unión reducida a una porción Fab de una inmunoglobulina o molécula de Ig en relación con SpA de tipo silvestre (SpA_{ts}) o un dominio variante conocido de SpA (por ejemplo, el dominio Z). La proteína de unión a inmunoglobulina puede comprender además uno o más dominios modificados E, D, A, B, C o Z, donde cada dominio incluye una sustitución aminoácida en la posición 29. En el caso de los dominios E, D, B, A o C, la glicina en la posición 29 se reemplaza por un aminoácido distinto de alanina o triptófano y en el caso del dominio Z, la alanina en la posición 29 se reemplaza por un aminoácido que no sea glicina o triptófano. En algunas realizaciones, la glicina en la posición 29 se reemplaza por un aminoácido distinto de alanina, treonina y triptófano y la alanina en la posición 29 se reemplaza por un aminoácido distinto de glicina, treonina y triptófano. En algunas realizaciones, las variantes de secuencia de aminoácidos pueden diferir de la secuencia de aminoácidos parental de la que proceden, en la sustitución, eliminación y/o inserción de uno o más aminoácidos en cualquier parte dentro de la secuencia de aminoácidos parental e incluyendo una sustitución de un resto de aminoácido al menos en la posición 29. En algunas realizaciones, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 85%, o al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 96 %, o al menos aproximadamente un 97 %, o al menos aproximadamente un 98 % de identidad con la secuencia parental (es decir, los dominios de SpA _{ts} o el dominio Z), donde dichas variantes se unen a la porción Fc de una inmunoglobulina, aunque muestran una unión reducida a una porción Fab de inmunoglobulina en relación con una secuencia de aminoácidos de SpA que incluya una glicina o una alanina en la posición 29.

30 El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos, cuando están alineadas óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT que usan ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos un 70 % de identidad de secuencia, o al menos un 80 % de identidad de secuencia, o al menos un 85% de identidad de secuencia, o al menos un 90 % de identidad de secuencia, o al menos un 95% de identidad de secuencia o más. Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa típicamente como una secuencia de referencia (por ejemplo, la secuencia parental), con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula posteriormente el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

40 La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, *por ejemplo*, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Pro. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase de manera general Ausubel et al., 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 et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (accesible al público a través del servidor de Internet del Instituto Nacional de Salud NCBI). Normalmente, se pueden usar los parámetros por defecto del programa para realizar la comparación de secuencias, aunque también se pueden usar parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLAST utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

55 En algunas realizaciones, una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención incluye al menos dos o más, o al menos tres o más, o al menos cuatro o más, o al menos cinco o más de los dominios denominados E, D, A, B, C y Z, con la condición de que esté presente un dominio Z en el que la alanina en posición 29 esté reemplazada con lisina, leucina o arginina, donde cada uno de los dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más dominios incluyen al menos una glicina (por ejemplo, en el caso de los dominios E, D, A, B y C) o alanina (en el caso del dominio Z) en la posición 29 reemplazada por un resto de aminoácido distinto de una glicina,

60

alanina, triptófano y treonina y donde la proteína de unión a inmunoglobulina muestra una unión reducida a una porción Fab de la molécula de Ig en relación con una proteína de unión a inmunoglobulina que incluye una glicina o alanina en la posición 29.

- 5 En algunas realizaciones, una proteína de unión a inmunoglobulina según la invención incluye multímeros del dominio Z (*por ejemplo dos o más del dominio Z*), donde al menos uno de los monómeros tiene la alanina en la posición 29 sustituida por una lisina, leucina o arginina en cada uno de los monómeros incluye al menos una glicina o alanina en posición 29 sustituida por un aminoácido distinto de glicina, alanina, triptófano y treonina, donde presente unión reducida a una porción de Fab de la molécula Ig con relación a una proteína que se une a inmunoglobulina que incluye una alanina o glicina en posición 29.
- 10 Los aminoácidos adecuados para reemplazar la glicina o la alanina en la posición 29 incluyen cualquiera de los aminoácidos naturales normales, excluyendo glicina, alanina y triptófano y en ciertas realizaciones, excluyendo glicina, alanina, triptófano y treonina. En algunas realizaciones, los aminoácidos naturales comprenden uno de lisina, arginina y leucina. En otras realizaciones, los aminoácidos naturales incluyen uno de lisina, arginina, leucina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, histidina, isoleucina, metionina, asparagina, prolina, serina, valina y tirosina. También podrían usarse aminoácidos que no son de origen natural y derivados de aminoácidos que son bien conocidos en la técnica para reemplazar la glicina o la alanina en la posición 29.

- 20 En la Tabla I se muestran ejemplos de modificaciones de dominio de SpA. Las proteínas de unión a inmunoglobulina abarcadas por la presente invención pueden además incluir un dominio Z en el que la alanina en posición 29 se ha sustituido por una lisina, leucina o arginina, cualquier combinación de uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis o más de los dominios (E, D, A, B, C and Z), donde cada dominio incluye una modificación en la posición 29, y donde la glicina o alanina en posición 29 está reemplazada por un resto aminoácido distinto de glicina, alanina y triptófano y en algunas realizaciones, distinto de glicina, alanina, triptófano y treonina. También están abarcadas por la presente invención proteínas de unión a inmunoglobulina que incluyen dos o más dominios de la misma clase (*por ejemplo, dos o más dominios Z*), donde cada dominio incluye una modificación en la posición 29, donde el resto de aminoácido en la posición 29 está reemplazado por leucina, lisina o arginina.
- 25

Tabla I

Dominios de SpA que incluyen modificaciones	Denominación
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por arginina	E-G29R
	D-G29R
	A-G29R
	B-G29R
	C-G29R
	Z-A29R
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por asparagina	E-G29N
	D-G29N
	A-G29N
	B-G29N
	C-G29N
	Z-A29N
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por ácido aspártico	E-G29D
	D-G29D

ES 2 612 166 T3

Dominios de SpA que incluyen modificaciones	Denominación
	A-G29D
	B-G29D
	C-G29D
	Z-A29D
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por cisteína	E-G29C
	D-G29C
	A-G29C
	B-G29C
	C-G29C
	Z-A29C
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por glutamina	E-G29Q
	D-G29Q
	A-G29Q
	B-G29Q
	C-G29Q
	Z-A29Q
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por ácido glutámico	E-G29E
	D-G29E
	A-G29E
	B-G29E
	C-G29E
	Z-A29E
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por histidina	E-G29H
	D-G29H
	A-G29H
	B-G29H

ES 2 612 166 T3

Dominios de SpA que incluyen modificaciones	Denominación
	C-G29H
	Z-A29H
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por isoleucina	E-G29I
	D-G29I
	A-G29I
	B-G29I
	C-G29I
	Z-A29I
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por leucina	E-G29L
	D-G29L
	A-G29L
	B-G29L
	C-G29L
	Z-A29L
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por lisina	E-G29K
	D-G29K
	A-G29K
	B-G29K
	C-G29K
	Z-A29K
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por metionina	E-G29M
	D-G29M
	A-G29M
	B-G29M
	C-G29M
	Z-A29M

ES 2 612 166 T3

Dominios de SpA que incluyen modificaciones	Denominación
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por fenilalanina	E-G29F
	D-G29F
	A-G29F
	B-G29F
	C-G29F
	Z-A29F
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por prolina	E-G29P
	D-G29P
	A-G29P
	B-G29P
	C-G29P
	Z-A29P
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por serina	E-G29S
	D-G29S
	A-G29S
	B-G29S
	C-G29S
	Z-A29S
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por treonina	E-G29T
	D-G29T
	A-G29T
	B-G29T
	C-G29T
	Z-A29T
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por tirosina	E-G29Y
	D-G29Y

Dominios de SpA que incluyen modificaciones	Denominación
	A-G29Y
	B-G29Y
	C-G29Y
	Z-A29Y
E, D, A, B, C o Z o el dominio de glicina 29 o alanina 29 reemplazada por valina	E-G29V
	D-G29V
	A-G29V
	B-G29V
	C-G29V
	Z-A29V

- Tal como se utilizan indistintamente en la presente memoria, las expresiones "dominio E", "dominio E de SpA" y "dominio E de proteína A de *Staphylococcus*" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO: 7 o aquel codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1.
- 5 El "dominio E" es un polipéptido de 51 aminoácidos que se pliega en una estructura de haz de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab a través de restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio E según la invención es al menos un 70 % idéntico, o al menos un 80 % idéntico, o al menos un 90 % idéntico o al menos un 95 % o más idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7.
- 10 Tal como se utilizan indistintamente en la presente memoria, las expresiones "dominio D", "dominio D de SpA" y "dominio D de proteína A de *Staphylococcus*" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO: 8 o codificado, *por ejemplo*, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. El "dominio D" es un polipéptido de 61 aminoácidos que se pliega en una estructura de haz de tres hélices. Es capaz de unirse Fc a través de restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab a través de restos sobre la superficie
- 15 de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio D descrito en la presente memoria es al menos un 70 % idéntico, o al menos un 80 % idéntico, o al menos un 90 % idéntico o al menos un 95 % o más idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8.
- Tal como se utilizan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio A", "dominio A de SpA" y "dominio A de proteína A de *Staphylococcus*" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO: 3 o codificado, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. El "dominio A" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de haz de tres hélices. Es capaz de unirse Fc a través de restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab a través de restos sobre la superficie
- 20 de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio A descrito en la presente memoria es al menos un 70 % idéntico, o al menos un 80 % idéntico, o al menos un 90 % idéntico o al menos un 95 % o más idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.
- 25 Tal como se utilizan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio B", "dominio B de SpA" y "dominio B de proteína A de *Staphylococcus*" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO: 10 o codificado, *por ejemplo*, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 4. El "dominio B" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de haz de tres hélices. Es capaz de unirse Fc a través de restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab a través de restos sobre la superficie
- 30 de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio B descrito en la presente memoria es al menos un 70 % idéntico, o al menos un 80 % idéntico, o al menos un 90 % idéntico o al menos un 95 % o más idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.
- Tal como se utilizan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio C", "dominio C de SpA" y "dominio C de proteína A de *Staphylococcus*" se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone
- 35

en la SEQ ID NO: 11 o codificado, *por ejemplo*, por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. El "dominio C" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de haz de tres hélices. Es capaz de unirse Fc a través de restos sobre la superficie de las hélices 1 y 2, o a Fab a través de restos sobre la superficie de las hélices 2 y 3. En algunas realizaciones, un dominio C descrito en la presente memoria es al menos un 70 % idéntico, o al menos un 80 % idéntico, o al menos un 90 % idéntico o al menos un 95 % o más idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11.

como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, los términos "dominio Z," "dominio Z de SpA" y "dominio Z de proteína A," se refieren al polipéptido de triple hélice, de 59 aminoácidos que es una variante del dominio B de la proteína A. La secuencia de aminoácidos del dominio Z se establece en la SEQ ID NO: 12. Un dominio Z ejemplar se describe en Nilsson et al., Protein Engng., 1:107-113 (1997), cuyo contenido competo de incorpora por referencia en la presente memoria.

Los términos "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (utilizados indistintamente en la presente memoria) se refieren a una proteína que tiene una estructura de cadena básica de cuatro polipéptidos que consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina monocatenaria" o "anticuerpo monocatenario" (utilizado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de polipéptidos de doble cadena, que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlazadores peptídicos intercatenarios, que tiene la capacidad de 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 comprenden 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una estructura β -laminar y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se citan además en la presente memoria como "constantes" o "variables", basándose en la relativa falta de variación de secuencia dentro de los dominios de varios miembros de clase en el caso de un dominio "constante", o en la variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de una clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpo o polipéptido se citan a menudo indistintamente en la técnica como "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Los dominios "constantes" de cadenas ligeras de anticuerpos se citan indistintamente como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de cadenas pesadas de anticuerpos se citan indistintamente como "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de cadenas ligeras de anticuerpos se citan indistintamente como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de cadenas pesadas de anticuerpos se citan indistintamente como "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", "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, dimerica 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 o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos pueden obtenerse *mediante* el tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos pueden expresarse solos o como parte de una proteína mayor denominada proteína de fusión. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y/o Fv. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen proteínas de fusión de Fc.

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

Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico", usados indistintamente en la presente memoria, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen un ADN de cadena sencilla, doble o triple, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (tal como puede encontrarse típicamente en ARN o ADN), o grupos de azúcares o fosfatos modificados o sustituidos. Además, se puede obtener un polinucleótido bicatenario a partir del producto de polinucleótido monocatenario de síntesis química sintetizando la hebra complementaria e hibridando las hebras en condiciones adecuadas, o sintetizando la cadena complementaria *de novo* usando una ADN polimerasa con un cebador adecuado. Una molécula de ácido nucleico puede adoptar 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 de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos enlazadores, tales como fluororribosa y tioato, y ramas de nucleótidos. Tal como se usa en la presente memoria, "ADN" o "secuencia

de nucleótidos" incluye no sólo las bases A, T, C y G, sino también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases, tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados y tioatos, uso de análogos de azúcar y estructuras de cadena principal modificadas y/o alternativas, tales como poliamidas. En una realización particular, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de SpA.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unión reducida" se refiere a cualquier disminución en la unión de una porción Fab (o F(ab)₂) de una molécula de inmunoglobulina a una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención con respecto a una proteína de unión a inmunoglobulina que incluya un resto de aminoácido de alanina o glicina en la posición 29. Por ejemplo, la unión a una porción Fab puede disminuirse en aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % o más, en relación con una proteína de unión a inmunoglobulina que incluye un resto de aminoácido de glicina o de alanina en la posición 29. En algunas realizaciones, la unión a una porción Fab de una molécula de inmunoglobulina se reduce en al menos un 50% o más en relación con la unión a una proteína de inmunoglobulina que incluya una glicina o alanina en la posición 29. En otra realización, la unión a una porción Fab de una molécula de inmunoglobulina se reduce en al menos un 70% o más. En otra realización más, la unión a una porción Fab de una molécula de inmunoglobulina se reduce en al menos un 90 % o más, o al menos un 95 % o más, o al menos un 99 % o más. En una realización, la unión a una porción Fab de una molécula de inmunoglobulina es indetectable usando técnicas convencionales en la técnica y las descritas en la presente memoria. La unión a una molécula de inmunoglobulina puede detectarse usando técnicas bien conocidas, incluyendo las descritas en la presente memoria 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 la porción Fc de una molécula de inmunoglobulina con una constante de disociación de al menos aproximadamente 10⁻⁸M para un único dominio de unión a IgG, o de aproximadamente 10⁻¹¹ M para 5 dominios de unión de IgG en tándem. En otras realizaciones, una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la invención se une a la porción Fc de una molécula de inmunoglobulina con una constante de disociación de aproximadamente 10⁻⁵ M para un único dominio de unión a IgG, o de aproximadamente 10⁻⁶ para la proteína A intacta con cinco dominios de unión en tándem.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unión aumentada" se refiere a cualquier aumento en la unión de una porción Fab (o F(ab)₂) de una molécula de inmunoglobulina a una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención con respecto a una proteína de unión a inmunoglobulina que incluya un resto de aminoácido de alanina en la posición 29. Por ejemplo, la unión a una porción Fab puede aumentarse en aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 50 %, o aproximadamente un 60 %, o aproximadamente un 70 %, o aproximadamente un 80 %, o aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 96 %, o aproximadamente un 97 %, o aproximadamente un 98 %, o aproximadamente un 99 % o más, en relación con una proteína de unión a inmunoglobulina que incluya un resto de aminoácido de alanina en la posición 29. La unión a una molécula de inmunoglobulina puede detectarse usando técnicas bien conocidas, incluyendo las descritas en la presente memoria e incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, cromatografía de afinidad y análisis de resonancia de plasmón superficial.

El término "unión a Fc", "se une a una porción Fc" o "unión a una porción Fc" se refiere a la capacidad de una proteína de unión a inmunoglobulina descrita en la presente memoria, para unirse a la parte cristalizante (Fc) de un anticuerpo. En algunas realizaciones, una proteína de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención se une a una porción Fc de un anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG4 humana) con una afinidad de al menos 10⁻⁷ M, o de al menos 10⁻⁸ M, o de al menos 10⁻⁹ M.

El término "separación por afinidad" o "purificación por afinidad", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier técnica de purificación o ensayo que implique la adición de una muestra que contiene un analito diana (por ejemplo, una inmunoglobulina) a un soporte sólido que porta una proteína de unión a inmunoglobulina, como se describe en la presente memoria.

El término "cromatografía", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de técnica que separe el analito (por ejemplo, una inmunoglobulina) para ser medido a partir de otras moléculas en la mezcla y que permita aislarla.

El término "cromatografía de afinidad", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un modo de cromatografía en el que el analito que se va a separar se aísla por su interacción con una molécula (por ejemplo, una proteína de unión a inmunoglobulina) que interactúa específicamente con el analito.

II. Estructura de SpA y sitios de unión a Inmunoglobulina

La SpA es una proteína de aproximadamente 42 kDa procedente de la bacteria *Staphylococcus aureus* y contiene cinco dominios de unión a inmunoglobulina (Ig) extracelulares en tándem altamente homólogos en el extremo N-

terminal, denominados E, D, A, B y C. Cada dominio extracelular de SpA posee sitios de unión a Ig distintos. Un sitio es para Fc γ (la región constante de la clase IgG de Ig) y el otro es para la porción Fab de ciertas moléculas de Ig (la porción de Ig que es responsable del reconocimiento del antígeno). Se ha comunicado que cada uno de los dominios contiene un sitio de unión a Fab. La porción de no unión a Ig de SpA está situada en el extremo C-terminal y se denomina región X o dominio X.

La clonación del gen que codifica SpA se describe en la patente de EE.UU. No. 5,151,350.

III. Generación y Expresión de Variantes de SpA

Las variantes de SpA de la presente invención pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar técnicas estándar para mutagénesis de sitio dirigido de ácidos nucleicos tales como las descritas, por ejemplo, en el manual de laboratorio titulado Molecular Cloning de Sambrook, Fritsch y Maniatis. Adicionalmente, pueden usarse técnicas de biología molecular estándar que implican mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En algunas realizaciones, las variantes de SpA se generan usando técnicas de ingeniería genética estándar. Por ejemplo, puede clonarse una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio de SpA o partes de la misma en un vector adecuado para la expresión en una célula hospedadora adecuada. Se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados e incluyen típicamente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la variante de SpA.

Las variantes de SpA descritas en la presente memoria también pueden sintetizarse químicamente a partir de precursores de aminoácidos para fragmentos usando métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen métodos de síntesis de péptidos en fase sólida tales como las estrategias Boc (terc-butiloxicarbonilo) o Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) (véanse, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.060.596; 4.879.378; 5.198.531; y 5.240.680).

La expresión de variantes de SpA se puede conseguir en células hospedadoras eucariotas, tales como levaduras, insectos o mamíferos o en células hospedadoras procariotas, *por ejemplo*, bacterias tales como *E. coli*.

Las variantes de SpA pueden expresarse en la superficie de un bacteriófago, de manera que cada fago contenga una secuencia de ADN que codifique una variante de SpA individual presentada en la superficie del fago. En esta estrategia, se prepara una biblioteca de variantes de SpA sintetizando oligonucleótidos aleatorios o semi-aleatorios en posiciones seleccionadas en la secuencia de SpA elegida para generar una variedad de aminoácidos en estas posiciones. El ADN codificante se inserta en un vector de fago adecuado, se introduce en una partícula de fago y se utiliza para infectar un hospedador bacteriano adecuado. Después, se clona cada una de las secuencias en un vector de fago y la variante SpA de interés (por ejemplo, que tiene una mutación en la posición 29) puede seleccionarse mediante la búsqueda de esos fagos que se unen a Fc pero no se unen a Fab (por ejemplo, mediante un método conocido como paneo). Los fagos recuperados de esta manera pueden amplificarse y repetirse la selección. Además, los fagos pueden aislarse y la secuencia de nucleótidos que codifica variantes de SpA seleccionadas se determina por secuenciación de nucleótidos.

IV. Unión de variantes de SpA a Fc y Fab

Tras la generación de las variantes de SpA, se determina la especificidad de unión de las variantes de SpA a porciones Fab o Fc de una inmunoglobulina usando técnicas estándar en la técnica y aquellas descritas en la presente memoria.

Por ejemplo, la variante SpA se puede construir con una etiqueta de histidina (etiqueta (His)₆) para su inmovilización por cromatografía de afinidad de níquel. La SpA unida a níquel puede entonces ensayarse respecto de la unión a Fc y Fab añadiendo los fragmentos adecuados a la resina. El material no unido se elimina por lavado y se detectan Fc y Fab en la muestra de elución mediante electroforesis en gel.

Como alternativa, la unión de Fc y Fab se puede medir por análisis de resonancia de plasmón superficial. La variante de SpA se inmoviliza en una microplaca usando química de amina reactiva, y el fragmento Fc o Fab se hace fluir sobre la microplaca. Si el Fc o Fab se une, se observa un aumento en la señal de resonancia de plasmón superficial.

La SpA también puede inmovilizarse en perlas de cromatografía. La unión de Fc o Fab se observa comparando los picos de flujo y elución para la resina de SpA.

V. Uso de SpA y sus variantes para matrices de cromatografía de enmascaramiento

La presente invención también proporciona un método para preparar una matriz de cromatografía que comprenda al menos una proteína de unión a inmunoglobulina con afinidad por la parte Fc de un anticuerpo y que tenga afinidad reducida o nula para la porción Fab del anticuerpo. En una realización, dicho método comprende: (a) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio Z de SpA aislado; (b) mutar la secuencia de ácido nucleico

para codificar una proteína variante donde al menos la alanina en posición 29 se ha reemplazado por una leucina, lisina o arginina; (c) expresar la variante de la proteína en una célula hospedadora (*por ejemplo*, una célula procariótica o una célula eucariota adecuada); (d) recuperar la variante proteica de la célula hospedadora; y (e) acoplar la variante proteica a un soporte sólido.

- 5 Las matrices de soporte sólidas incluyen, pero sin limitación, vidrio de poro controlado, agarosa, metacrilato y poliestireno. La proteína se puede acoplar a la matriz, por ejemplo, por reacción química de amina reactiva o de tiol reactivo.

Los ejemplos siguientes no deberían constituir una limitación. Los contenidos de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como las figuras, se incorporan a la presente memoria por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de vectores que contienen variantes de SpA

Se sintetiza un gen que codifica el "dominio B" de proteína A mediante un método estándar utilizando un sintetizador de ADN. El extremo 5' del gen incluye un codón para una metionina de iniciación así como seis codones de histidina en el extremo 3' del gen. El gen se proporciona en el vector pJ56:8620. El vector parental pJ56 confiere resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol y gentamicina. Se introducen en ambos extremos 5' y 3' del gen los sitios para enzimas de restricción adecuados para la posterior clonación del gen en vectores de expresión. En la figura 5 se muestra un mapa de plásmido del vector.

La glicina en la posición 29 se muta a cada uno de los otros 19 aminoácidos por métodos basados en la PCR usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los cebadores fosforilados se adquieren a través de IDT DNA (Coralville, IA), como solución 100 µM en tampón Tris EDTA. El cebador mutagénico tiene la secuencia: 5'(P)GAAGAACAACGCAACNNNTTCATTCAGA (SEQ ID NO: 19) donde NNN representa las bases que codifican el aminoácido en la posición 29. El cebador no mutagénico tiene la secuencia 5'(P)GTTCAGGTTCCGGCAGATGCAGGAT (SEQ ID NO: 20). La PCR se realiza en reacciones de 50 µl que contienen dNTP (cada uno, 0,2 mM), 0,5 mM de cada cebador, 10 pg de molde de plásmido y 1 U de enzima Phusion. La PCR se lleva a cabo de acuerdo con el esquema señalado en la Tabla II.

Tabla II: condiciones de la PCR

Descripción del ciclo	Temperatura	Tiempo	N.º de ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	30 segundos	1 ciclo
Desnaturalización	98 °C	30 segundos	25 ciclos
Hibridación	56 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	2 minutos	
Extensión final	98 °C	10 minutos	1 ciclo
	4 °C	Retención	

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

Las células competentes de *E. coli* (New England Biolabs, Ipswich, MA) se transforman con 2 µl de la reacción de PCR tratada con DpnI. Las células se descongelan sobre hielo y se añaden 2 µl de la reacción de PCR a 25 µl de células. Después de aproximadamente 30 minutos de incubación en hielo, las células se someten a choque térmico durante 30 segundos a aproximadamente 42 °C. Se deja que las células se recuperen durante aproximadamente 5 minutos sobre hielo y luego se añaden 125 µl de medio SOC (New England BioLabs). Las células se incuban durante aproximadamente una hora a 37 °C y después se siembran 100 µl en placas LB (Northeast Laboratory Services, Winslow, ME) que contienen 100 µg/ml de ampicilina y se cultivan durante una noche a aproximadamente 37 °C. Con el fin de obtener ADN purificado, se escogen colonias individuales para su cultivo durante una noche en LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. El ADN se purifica utilizando kits spin mini-prep de Qiagen (Valencia, CA).

El cebador pJR (5' GAATATGGCTCATAACACCCCTTG) (SEQ ID NO: 21) se utiliza para secuenciar el ADN mini-preparado para confirmar la identidad de cada clon (MWG Biotech, Huntsville AL).

Tras la confirmación de secuencia de los diversos clones, el gen para cada variante de SpA se subclona en un plásmido para la expresión de la variante en células bacterianas. El plásmido se digiere con las enzimas de restricción adecuadas (New England Biolabs, Ipswich, MA) y el inserto se purifica en gel con geles Reliant FastLane de agarosa al 1% (Lonza Inc., Allendale, NJ). La banda correspondiente se corta del gel y se purifica usando el kit de extracción de gel de Qiagen (Valencia, CA). El inserto purificado se liga a la cadena principal de un vector de expresión adecuado usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA). El plásmido resultante se utiliza para transformar células competentes de *E. coli* NEB5 α como se ha descrito anteriormente.

10 Ejemplo 2: Expresión y purificación de variantes de proteína A

Puede utilizarse cualquier sistema de expresión bacteriana adecuado para expresar las diversas variantes de SpA. Por ejemplo, la proteína puede expresarse en *Escherichia coli*, tal como la cepa BL21 (DE3) (Promega, Madison WI) a partir de un vector pET, tal como pET11a (Novagen, Madison WI). Se recoge una sola colonia de una placa y se cultiva durante una noche a aproximadamente 37 °C en medio LB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina. El cultivo de una noche se diluye 100 veces en medio LB fresco que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y se cultiva hasta una densidad celular tal que la densidad óptica a 600 nm es \sim 0,8. Después de la adición de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido 1 mM, las células se cultivan durante dos horas adicionales. La expresión se confirma mediante análisis SDS-PAGE y de transferencia de Western. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de transferencia de Western de proteína A, que muestra que la expresión de la proteína A del vector PET11a:8620 en células *E. coli* BL21 (DE3) se detecta usando un anticuerpo de IgY de pollo anti-proteína A.

Las células se recogen mediante centrifugación (4000 rpm, 4 °C, 5 minutos) y se resuspenden en 3 ml de solución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20 mM. Las células se lisan por sonicación y los restos celulares se sedimentan por centrifugación (4000 rpm, 4 °C, 30 minutos). Las variantes de SpA se purifican utilizando columnas de centrifugación NiNTA (Qiagen), aplicando 400 μ l de lisado celular por columna de centrifugación. Las columnas se lavan con 2 x 600 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20 mM y la SpA se eluye en 2 x 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 200 mM. La SpA se dializa durante una noche en PBS. La concentración de proteína se confirma usando el ensayo de proteína Dc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con respecto a una curva patrón preparada con albúmina de suero bovino.

Ejemplo 3: Unión de variantes de SpA a fragmentos Fc y Fab

Posteriormente, se prueba en cada variante de SpA la capacidad de unirse a Fc y Fab usando resina de agarosa NiNTA (Qiagen). Los fragmentos Fc y F(ab)₂ se obtienen de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Cada variante de SpA se diluye a una concentración de 0,11 mg/ml, el Fc se diluye a una concentración de 0,44 mg/ml y el F(ab)₂ se diluye a una concentración de 0,92 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20 mM. La resina de agarosa NiNTA se resuspende y se pipetea aproximadamente 20 μ l de la suspensión de resina en un tubo de microcentrifugación de 0,5 ml. Posteriormente, se sedimenta la resina y se desecha el sobrenadante. La resina se lava con aproximadamente 100 μ l de PBS con imidazol 20 mM, se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos y se sedimenta de nuevo. El sobrenadante se desecha. Se cargan aproximadamente 250 μ l de cada variante de SpA a 0,11 mg/ml o de cada control de PBS sobre la columna de resina por duplicado y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se sedimenta posteriormente y el sobrenadante se conserva para su análisis. El sedimento se lava tres veces con 100 μ l de PBS más imidazol 20 mM cada vez, se incuba durante 5 minutos y se sedimenta de nuevo. El sobrenadante se desecha. Se prueba la unión de aproximadamente 100 μ l de Fc o F(ab)₂ con cada una de las variantes de SpA o el control de PBS incubando con la resina durante aproximadamente 30 minutos. La resina se sedimenta posteriormente y el sobrenadante se guarda para su análisis. La resina se lava de nuevo tres veces con unos 100 μ l de PBS más imidazol 20 mM cada vez, se incuba durante 5 minutos y se sedimenta de nuevo. Esta vez se desecha el sobrenadante. La fracción unida se eluye con aproximadamente 100 μ l de PBS más imidazol 20 mM, se incuba durante aproximadamente 15 minutos y se sedimenta. El sobrenadante se conserva para su posterior análisis. Las muestras se analizan posteriormente mediante SDS-PAGE en geles de gradiente al 4-15 % adquiridos a través de Bio-Rad Laboratories, CA, como se ilustra en las figuras 9-12.

Se prueba la unión de cinco variantes de la proteína A a Fc y F(ab)₂ mediante análisis de biosensor de resonancia de plasmón superficial. Todos los experimentos se llevan a cabo en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Tween-20 al 0,005%. Las variantes de la proteína A se inmovilizan en una microplaca de sensor ProteOn GLC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) mediante química de amina, con acoplamiento a un nivel de 500 UR. Se preparan tres diluciones seriadas de fragmentos Fc y F(ab)₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), con concentraciones de proteínas en el intervalo de 45 nM a 185 pM, y cada concentración se analiza por duplicado. Cada concentración de Fc o F(ab)₂ se inyecta durante 250 segundos, seguido por 3,5 horas de PBS para medir las velocidades de disociación. Los datos se ajustan a un modelo heterogéneo de dos sitios para obtener velocidades de asociación y disociación (k_{on} y k_{off}). Como se representa en las Figuras 13A-13E, la proteína con glicina 29 de tipo silvestre y cada una de G29A, G29R, G29K y G29L se unen a Fc. Las Figuras 14A-14E observa

que la G29 de tipo silvestre se une a Fab y que G29A muestra una unión a F(ab)2 débil pero detectable. No se observa unión a F(ab)2 para G29R, G29K o G29L.

- 5 La unión a Fc y Fab también se evalúa después de la inmovilización de las variantes de SpA sobre resinas de cromatografía. Las perlas de vidrio de poro controlado (50 mL cada una, tamaño de partícula medio de 60 µm, diámetro medio de poro de 800Å) se funcionalizan con Proteína A o variante de Proteína A según el método para acoplar la Proteína A a un soporte sólido descrito en la solicitud de patente Internacional No. WO 90/09237, cuyo contenido completo se incorpora a la presente memoria por referencia. Después del acoplamiento del ligando, las muestras se lavan tres veces con 150 ml de volumen de cada una (en orden): Tris 0,1 M con NaCl 0,15 M, pH 8 seguido de ácido acético 0,05 M. Posteriormente, las muestras se equilibran y se almacenan en PBS con azida.
- 10 Las resinas de afinidad de vidrio de poro controlado inmovilizadas con el ligando correspondiente se envasan en columnas OmniFit de 6,6 mm de di x 70 mm de l. Los tampones usados en el experimento son: (A) tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2; y (B) fosfato de sodio 50 mM, pH 2, y el caudal es de 1,2 ml/min. Después de equilibrar la columna en el tampón de partida A, se inyectan en la columna 100 µl de F(ab)2 o Fc a 1- 2 mg/ml (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en tampón A. Después de 10 volúmenes de columna (VC) del tampón A, el
- 15 tampón B se mezcla en más de 20 VC en un gradiente lineal. Se hacen pasar diez volúmenes de columna más de tampón B por la columna antes de que la columna se regenerara mediante 2 VC de hidrocloreuro de guanidina 6 M. Como se representa en las Figuras 15A y 15B, la proteína con glicina 29 de tipo silvestre y cada una de G29A, G29R, G29K y G29L se unen a Fc. Se observa que la G29 de tipo silvestre se une a Fab y G29A muestra una unión a F(ab)2 débil pero detectable. No se observa unión a F(ab)2 para G29R, G29K o G29L.
- 20 En otro experimento ilustrativo, se ensaya un conjunto completo de variantes de la proteína A para determinar la unión a Fc y Fab mediante su captura en resina de agarosa NiNTA (Qiagen). Brevemente, se añaden en exceso a la resina variantes de la proteína A marcadas con His con una sustitución de aminoácidos en la posición 29 de la SpAts, la resina se lava con PBS que contiene imidazol 20 mM seguido de la adición de la porción Fc o Fab de una inmunoglobulina. La resina se lava de nuevo con PBS que contiene imidazol 20 mM, seguido de elución de
- 25 fragmentos de SpA e IgG con PBS que contiene imidazol 200 mM. Las fracciones de elución resultantes se analizan en un gel de gradiente al 4-20 % (BioRad) seguido de tinción con azul de Commassie (Pierce). Se usa resina sin proteína A como control negativo. Los resultados de un experimento ejemplar se resumen a continuación en la tabla III. Aunque no se observa diferencia aparente en la unión a Fc entre las diferentes variantes, la unión a Fab está marcadamente reducida para la mayoría de las variantes. La mayoría de las variantes muestran una unión a Fab que es un 15 % menor en comparación con el tipo silvestre. Se observa una unión residual a Fab del 24 % o más
- 30 para tres de las variantes (G29A, G29T y G29W).

Tabla III

Variante	Unión a Fab cuantificada por densitometría (porcentaje de glicina de tipo silvestre)
TS	100
G29K	4
G29R	9
G29L	7
G29A	24
G29C	5
G29D	8
G29E	11
G29F	7
G29H	5
G29I	8

Variante	Unión a Fab cuantificada por densitometría (porcentaje de glicina de tipo silvestre)
G29M	9
G29N	8
G29P	14
G29Q	11
G29S	8
G29T	37
G29V	10
G29W	66
G29Y	11
control	11

La memoria descriptiva se entenderá mejor a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva que se incorporan a la presente por referencia. Las realizaciones en la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de realizaciones en esta invención y no deben interpretarse como limitativas de su alcance. El experto en la materia reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones están abarcadas por esta invención. Todas las publicaciones y las invenciones se incorporan en su totalidad por referencia. En la medida en que el material incorporado por referencia contradiga o sea incompatible con la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva reemplazará cualquier material de este tipo. La cita de cualquiera de las referencias en la presente memoria no es una admisión de que dichas referencias sean técnica anterior respecto de la presente invención.

Salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, y así sucesivamente, utilizados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por 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 se pretenden obtener mediante la presente invención. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Dichos equivalentes están destinados a ser abarcados por las reivindicaciones más adelante.

Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria se ofrecen únicamente a modo de ejemplo y no pretenden ser limitativas de ninguna manera. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente como ilustrativos, indicándose el verdadero alcance y espíritu de la invención mediante las siguientes reivindicaciones. En particular, las diversas realizaciones descritas en la presente memoria pueden combinarse, a menos que se indique lo contrario o que sea técnicamente contradictorio.

Referencias:

Unión a Fab: Melissa A. Starovasnik, Mark P. O'connell, Wayne J. Fairbrother, y Robert F. Kelley (1999). Antibody variable region binding by Staphylococcal protein A: Thermodynamic analysis and location of the Fv binding site on E-domain. *Protein Science* 8, 1423-1431.

Unión constante a Fc: Susanne Gülich, Mathias Uhlén, Sophia Hober (2000) Protein engineering of an IgG-binding domain allows milder elution conditions during affinity chromatography. *Journal of Biotechnology* 76, 233-244

Listado de secuencias

<110> MILLIPORE CORPORATION

5 <120> NUEVAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A INMUNOGLOBULINA CON ESPECIFICIDAD MEJORADA

<130> P11129EP02

<140>

10 <141> 11/08/2009

<150> 61/212.812

<151> 11/08/2009

15 <150> 61/188.549

<151> 11/08/2009

<160> 22

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 159

<212> ADN

25 <213> Staphylococcus aureus

<400> 1

30 gcgcaacaaa acgctttcta tcaggactg aacatgccta acctgaacgc cgatcagcgt 60
aacggcttca tccaaagcct gaaggacgac ccgagccagt ccgcaaactg tctgggtgaa 120
gctcaaaaac tgaacgacag ccaggcaccg aaagctgac 159

<210> 2

<211> 177

35 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

40 gccaacaga acaaatata caagaccag cagtcgctg tctacgagat tctgaacatg 60
cctaactga atgaagaaca gcgcaacgg tttatcagt ctctgaagga cgatccttct 120
caatccacca acgtactggg cgaagcgaag aactgaacg aatctcaggc tccgaag 177

<210> 3

45 <211> 174

<212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 3

50 gcgacaaca acttaacaa agagcagcaa aacgcttct acgaaatct gaatatgcca 60
aatctgaacg aagagcagcg taacggttc atccaatctc tgaagacga tccgtcccag 120
tccgcaatc tgctggcgga ggctaaaaag ctgaacgaat cccaggctcc gaaa 174

55 <210> 4

<211> 174

<212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

60 <400> 4

gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcattt acgagatct gcattgccc 60
aacctgaacg aagaacaacg caacggttc attcagagcc tgaagacga cccatctcag 120
tccgctaacc tgctggcgga agcaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

65 <210> 5

ES 2 612 166 T3

<211> 174
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

5 <400> 5

gcggataaca aattcaacaa ggagcaacag aacgcattct atgaaattct gcacctgccg 60
 aatctgacgg aggagcaacg taacggcttt atccagtccc tgaaggatga tccgtctgtg 120
 tctaaagaga tcttggcgga ggcaaaaaaa ctgaatgatg cacaagctcc gaaa 174

10 <210> 6
 <211> 174
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

15 <400> 6

gtagacaaca aattcaataa agaacagcag aacgcattct atgaaatcct gcacctgccg 60
 aacctgaacg aagaacagcg taacggcttt atccagtccc tgaagagcga cccgagccag 120
 agcgaaatc tgctggcgga agcgaaaaag ctgaacgatg cccagggcgc gaaa 174

20 <210> 7
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

25 <400> 7

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

30 <210> 8
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

35 <400> 8

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

40 <210> 9
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

45 <400> 9

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

50 <210> 10
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

55 <400> 10

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

60

65

ES 2 612 166 T3

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gln Phe Ile Gln 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys 50 55

5 <210> 11
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 11

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

15 <210> 12
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 12

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

30 <210> 13
 <211> 174
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 13

35 gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcatctgccg 60
 aacctgaacg aagaacaacg caaccgcttc attcagagcc tgaaagacga cccatctcag 120
 tccgctaacc tgctggcgga agcaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

40 <210> 14
 <211> 174
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

45 <400> 14

gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcatctgccg 60
 aacctgaacg aagaacaacg caacaaattc attcagagcc tgaaagacga cccatctcag 120
 tccgctaacc tgctggcgga agcaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

50 <210> 15
 <211> 174
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 15

60 gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcatctgccg 60
 aacctgaacg aagaacaacg caacctgttc attcagagcc tgaaagacga cccatctcag 120
 tccgctaacc tgctggcgga agcaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

<210> 16
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

ES 2 612 166 T3

<400> 16

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

<210> 17
<211> 58
10 <212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 17

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

20 <210> 18
<211> 58
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

25 <400> 18

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

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

40 <220>
<221> base_modificada
<222> (16)..(18)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

45 <400> 19

gaagaacaac gcaacnntt cattcaga 28

50 <210> 20
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 20

60 gttcaggttc ggcagatgca ggat 24

<210> 21
<211> 24
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 612 166 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
5
<400> 21
gaatatggct cataacaccc ctg 24
10 <210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Etiqueta 6xHis sintética"
<400> 22
20 His His His His His His 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una proteína de unión a inmunoglobulina aislada que comprende uno o más dominios Z aislados de proteína A de *Staphylococcus*, en donde el uno o más dominios aislados comprende al menos el resto alanina en posición 29 del dominio Z que está reemplazado por leucina, lisina o arginina, en donde la proteína que se une a inmunoglobulina se une a una porción Fc de una inmunoglobulina pero presenta unión reducida a una porción Fab de la inmunoglobulina con relación a una proteína de unión a inmunoglobulina que incluye alanina o glicina en posición 29.
- 2.** Una proteína de unión a inmunoglobulina aislada según la reivindicación 1, que comprende al menos una porción de la región carboxi-terminal de la proteína A de *Staphylococcus*.
- 10 **3.** Una proteína aislada de unión a inmunoglobulina según cualquier reivindicación anterior, que además comprende el reemplazo de asparagina por otro resto de aminoácido en uno o más dominios aislados.
- 4.** Una proteína de unión a inmunoglobulina según la reivindicación 3, en donde la asparagina está en la posición 23.
- 5.** Una proteína de unión a inmunoglobulina según cualquier reivindicación anterior, en donde la inmunoglobulina es una IgG o un fragmento de la misma.
- 15 **6.** Una proteína de unión a inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción Fc de la inmunoglobulina es parte de una proteína de fusión de Fc.
- 7.** Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de unión a inmunoglobulina según cualquier reivindicación anterior.
- 8.** Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
- 20 **9.** Una matriz de cromatografía que comprende la proteína de unión a inmunoglobulina aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 acoplada a un soporte sólido.

Figura 1

Secuencias de ADN de los dominios de unión a IgG de ts de proteína A

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de ADN de dominio E

GCGCAACAAAACGCTTTCTATCAGGTAAGCATGCCTAACCTGAACGCCGATCAGCG
TAACGGCTTCATCCAAAGCCTGAAGGACGACCCGAGCCAGTCCGCAAACGTTCTGGGTG
AAGCTCAAAAACCTGAACGACAGCCAGGCACCGAAAGCTGAC

SEQ ID NO:2- Secuencia de ADN de dominio D

GCCCAACAGAACAAATTTAACAAGACCAGCAGTCCGCGTTCTACGAGATTCTGAACAT
GCCTAACCTGAATGAAGAACAGCGCAACGGTTTTATTTCAGTCTCTGAAGGACGATCCTT
CTCAATCCACCAACGTACTGGGCGAAGCGAAGAACTGAACGAATCTCAGGCTCCGAAG

SEQ ID NO:3- Secuencia de ADN de dominio A

GCCGACAACAACCTTCAACAAGAGCAGCAAAACGCTTTCTACGAAATCCTGAATATGCC
AAATCTGAACGAAGAGCAGCGTAACGGTTTCATCCAATCTCTGAAAGACGATCCGTCCC
AGTCCGCGAATCTGCTGGCGGAGGCTAAAAGCTGAACGAATCCAGGCTCCGAAA

SEQ ID NO:4- Secuencia de ADN de dominio B

GCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCCTGCATCTGCC
GAACCTGAACGAAGAACAACGCAACGGTTTCATTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTC
AGTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAA

SEQ ID NO:5- Secuencia de ADN de dominio C

GCGGATAACAAATTCAACAAGGAGCAACAGAACGCATTCTATGAAATCTGCACCTGCC
GAATCTGACGGAGGAGCAACGTAACGGCTTTATCCAGTCCCTGAAAGGATGATCCGTCTG
TGTCTAAAGAGATCCTGGCGGAGGCCAAAAAACTGAATGATGCACAAGCTCCGAAA

Figura 2

SEQ ID NO:6- Secuencia de ADN de dominio Z

GTAGACAACAAATTCATAAAGAACAGCAGAACGCTTTCTATGAAATCCTGCACCTGCC
GAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACGGCTTTATCCAGTCCCTGAAAGACGACCCGAGCC
AGAGCGCAAATCTGCTGGCGGAAGCGAAAAAGCTGAACGATGCCAGGCGCCGAAA

Figura 3

Alineamiento de secuencia del dominio de unión a IgG

```

E      -----AQQNAFYQVLMNPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK 51 (SEQ ID NO:7)
D      ADAQQNKFNKDQSAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK 61 (SEQ ID NO:8)
A      --ADNN-FNKEQQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNESQAPK 58 (SEQ ID NO:9)
B      ---ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAAPK 58 (SEQ ID NO:10)
C      ---ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKELAEAKKLNDQAAPK 58 (SEQ ID NO:11)
      :          ** *::*:***. ;***** * ;:*.**:*::***
    
```


Figura 4

SEQ ID NO: 12- Secuencia de aminoácidos de dominio Z

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKL
NDAQAPK

Solo se muestran las enzimas de un solo corte, para una lista más completa **BamHI (4)** véase la tabla más adelante

FIG.5

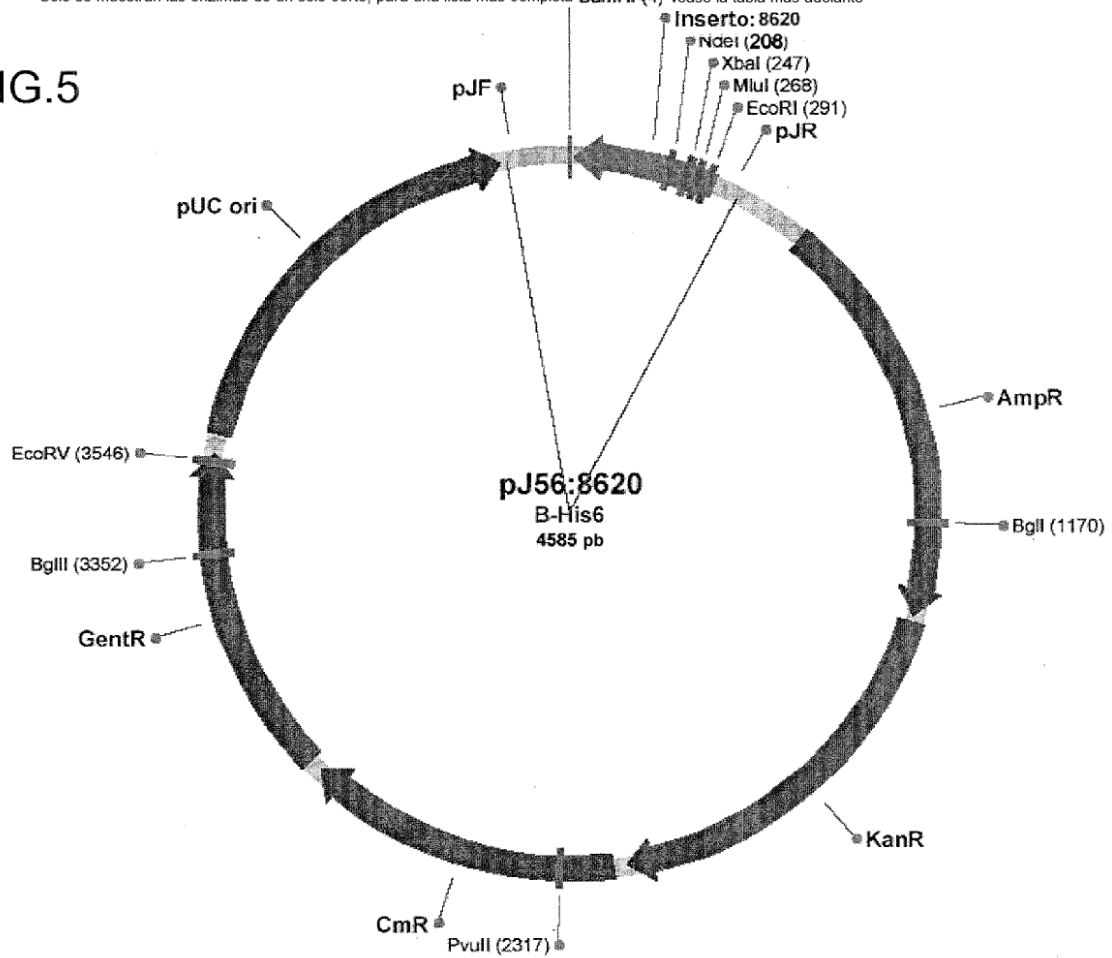


Figura 6

Secuencias de ADN de variante de dominio B

SEQ ID NO: 14-G29K

GCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCCTGCATCTGCC
GAACCTGAACGAAGAACAACGCAACAAATTCATTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTC
AGTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAA

SEQ ID NO: 13-G29L

GCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCCTGCATCTGCC
GAACCTGAACGAAGAACAACGCAACCGCTTCATTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTC
AGTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAA

SEQ ID NO: 15-G29R

GCAGACAATAAGTTCAATAAAGAGCAGCAGAACGCATTTTACGAGATCCTGCATCTGCC
GAACCTGAACGAAGAACAACGCAACCTGTTTCATTCAGAGCCTGAAAGACGACCCATCTC
AGTCCGCTAACCTGCTGGCGGAAGCAAAGAAGCTGAACGATGCACAGGCGCCGAAA

Figura 7

Secuencias de aminoácidos de variante de dominio B

SEQ ID NO: 17-G29K

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNKF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKL
NDAQAPK

SEQ ID NO: 16-G29L

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNLF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKL
NDAQAPK

SEQ ID NO: 18-G29R

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNRF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKL
NDAQAPK

Figura 8

La expresión de proteína A a partir de pET11a:8620/*E. coli* BL21(DE3) se detectó mediante transferencia de Western con anticuerpo anti-proteína A IgY de pollo

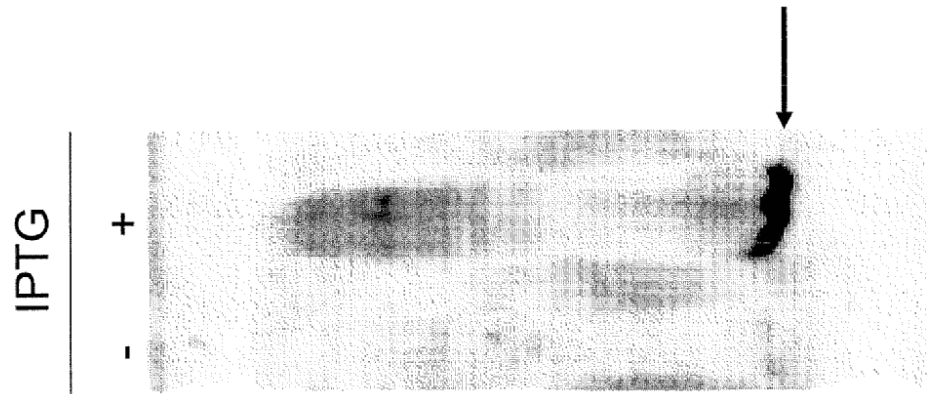


Figura 9

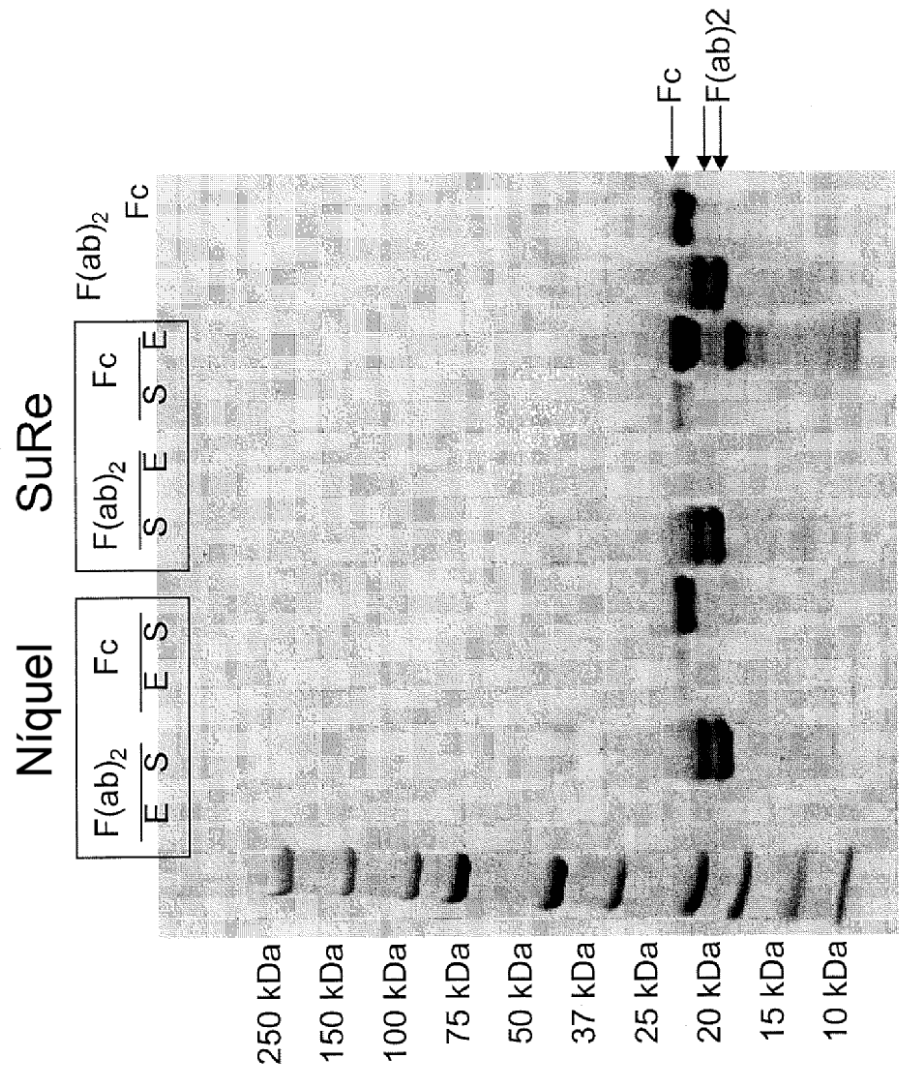


Figura 10

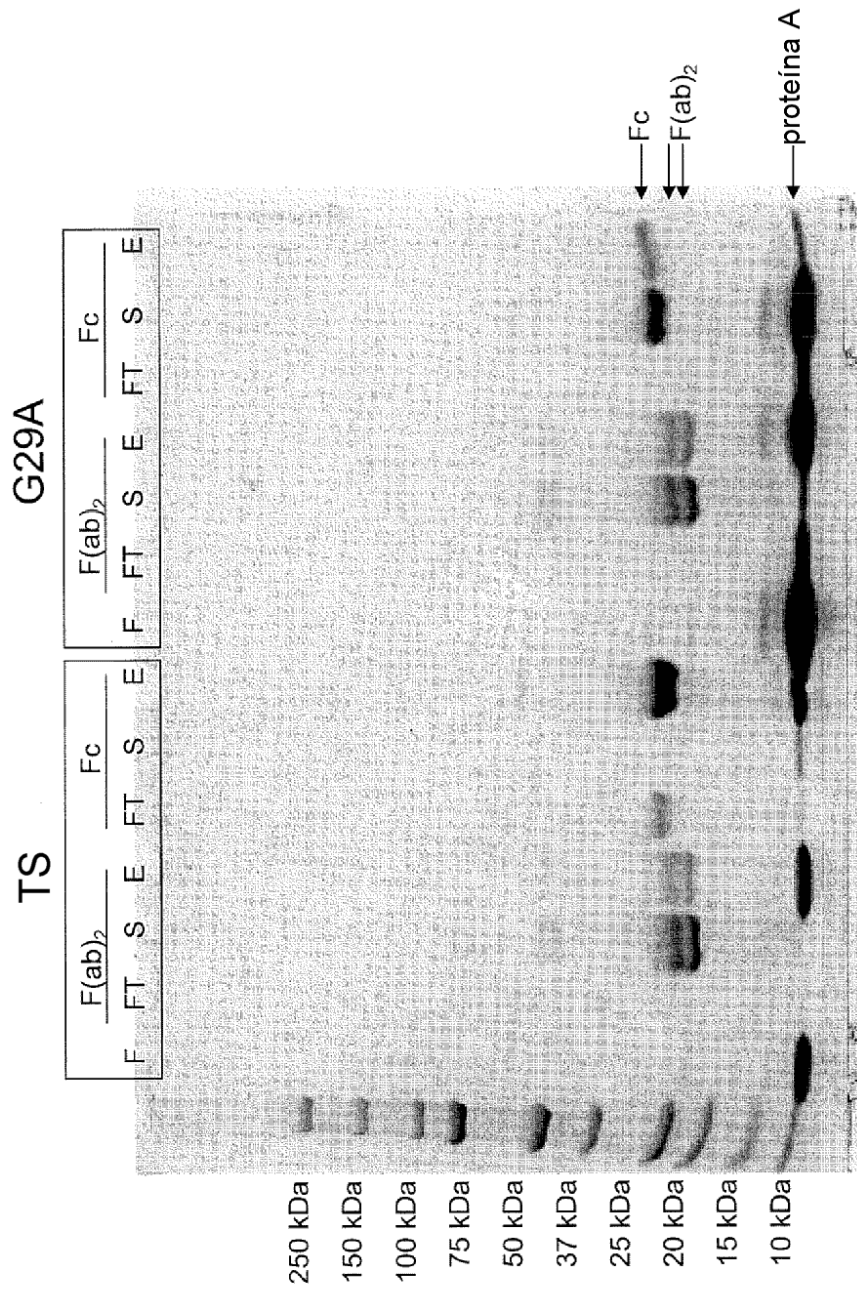


Figura 11

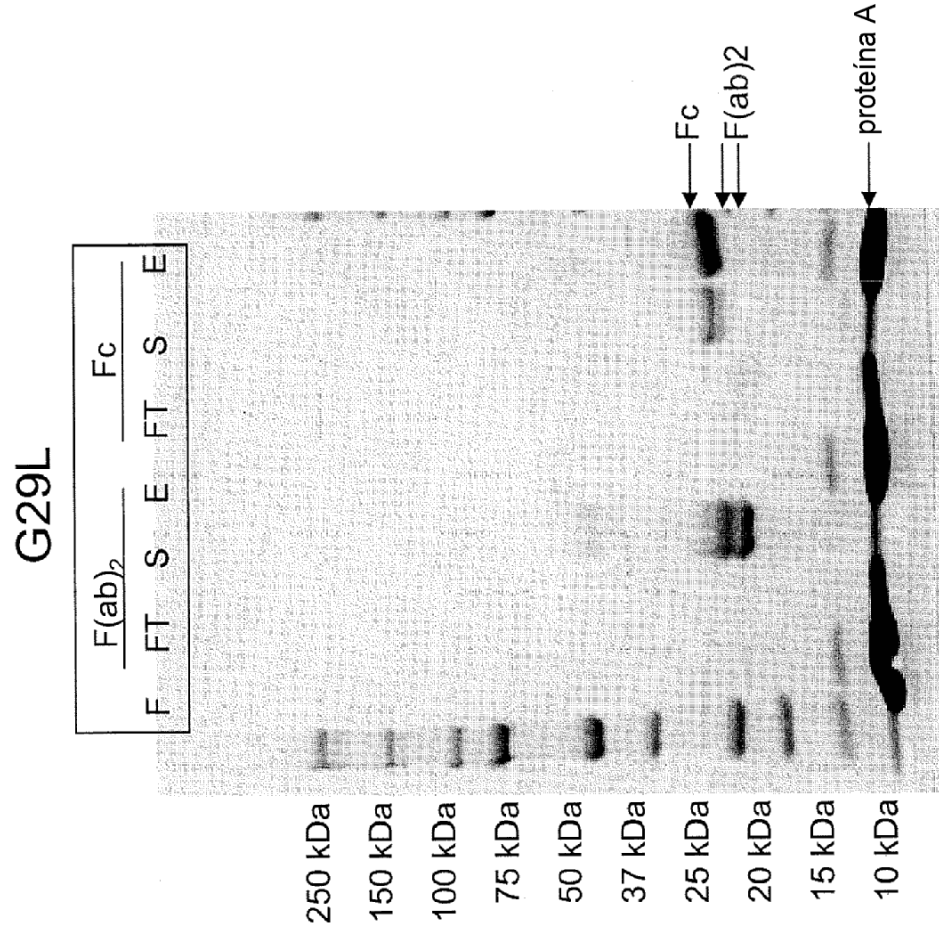


Figura 12

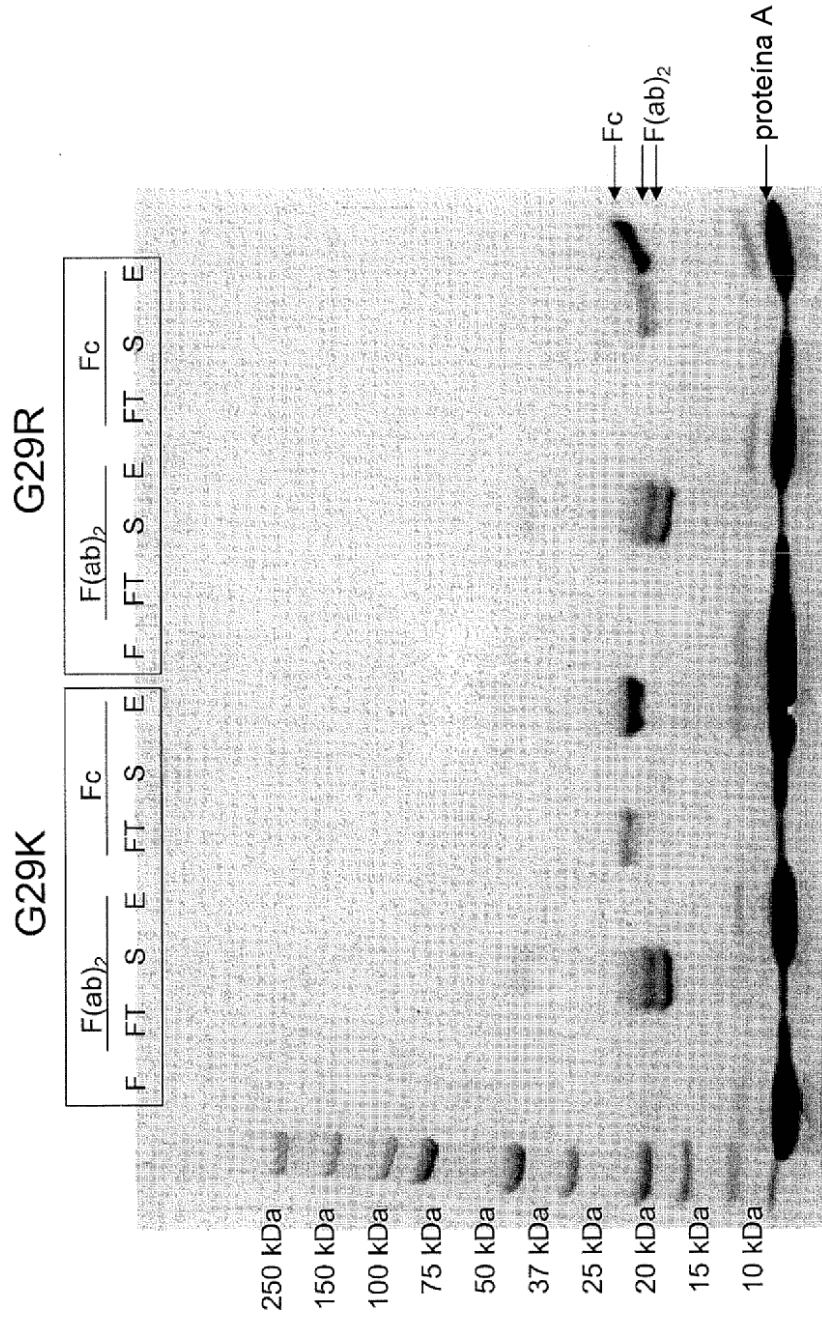


Figura 13A

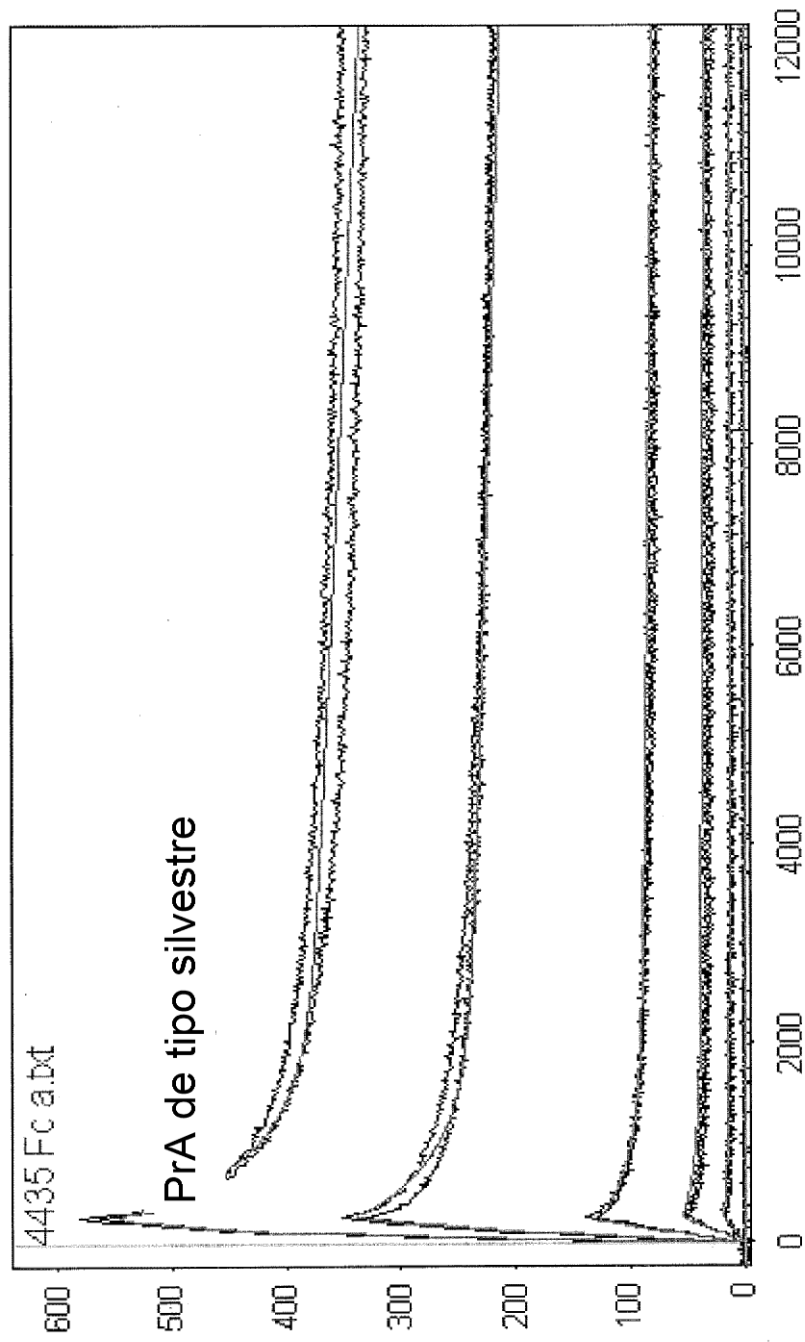


Figura 13B

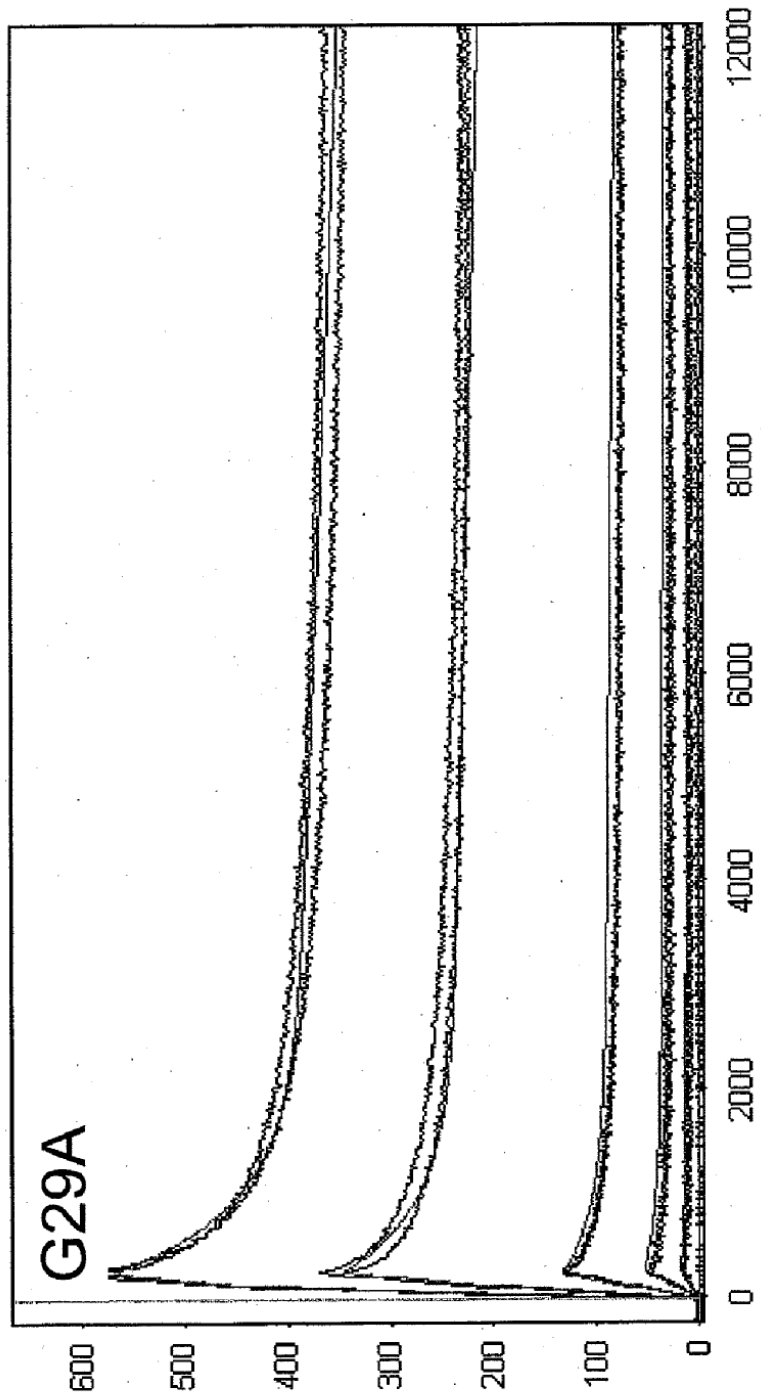


Figura 13C

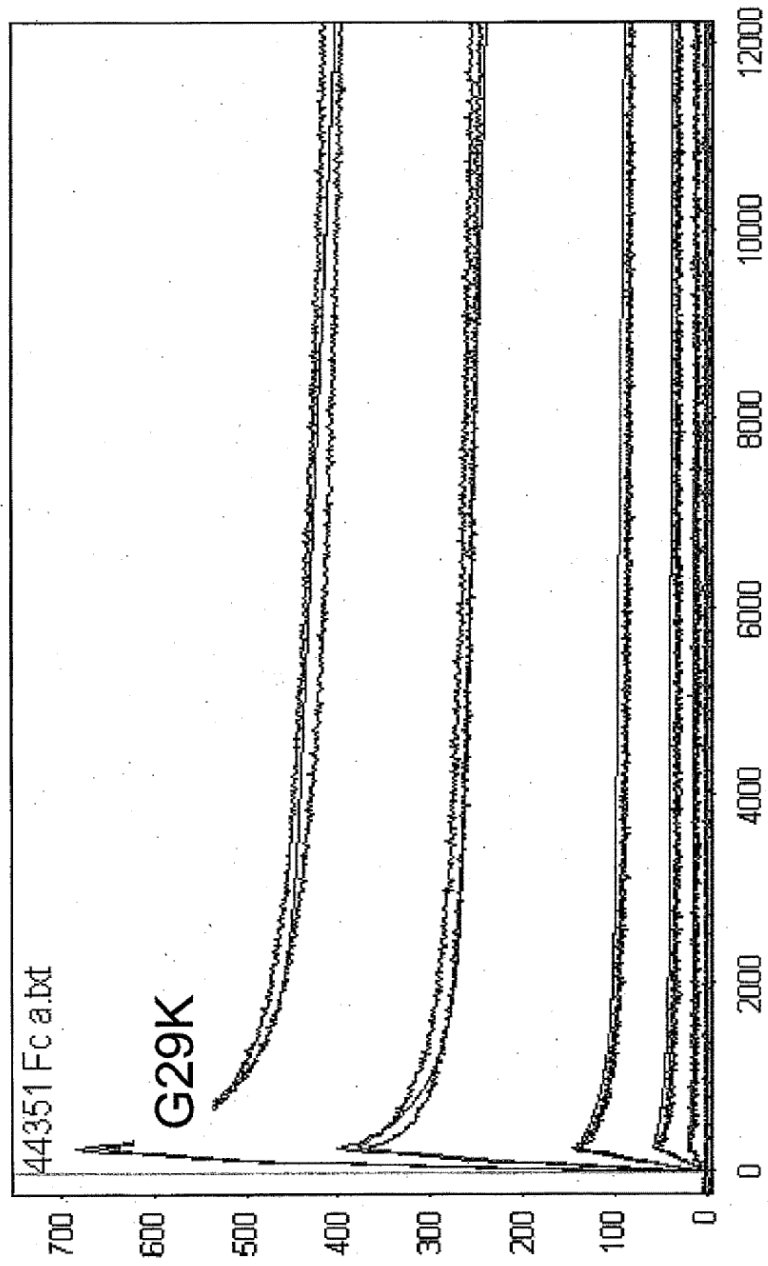


Figura 13D

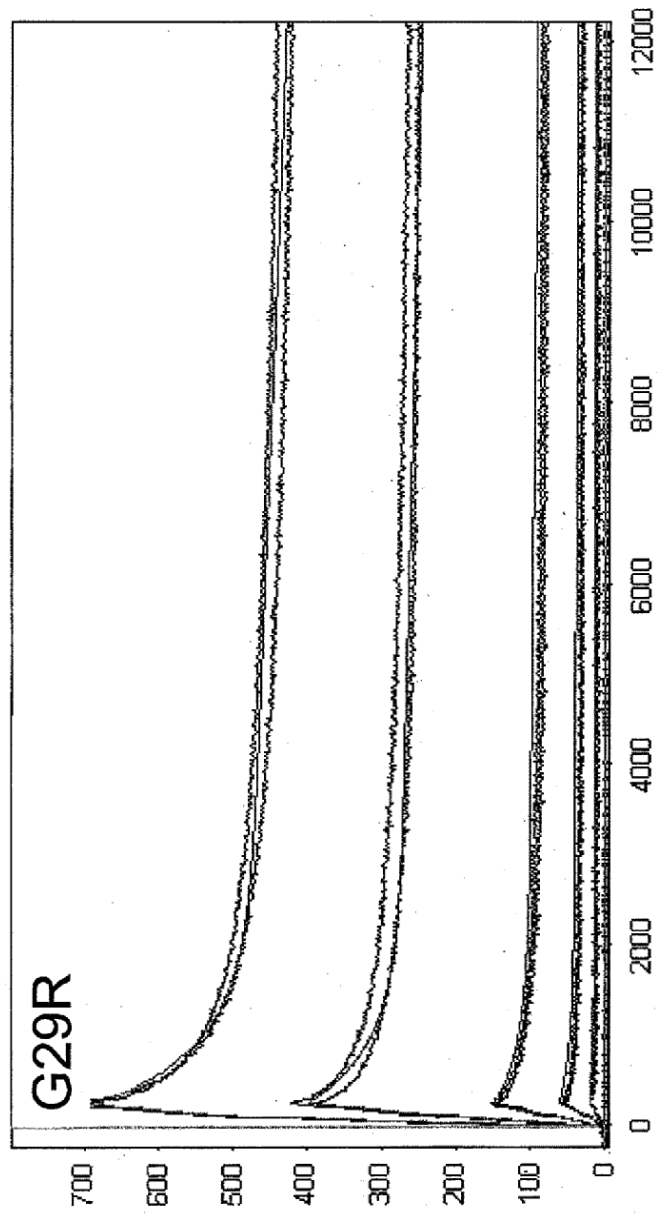


Figura 13E

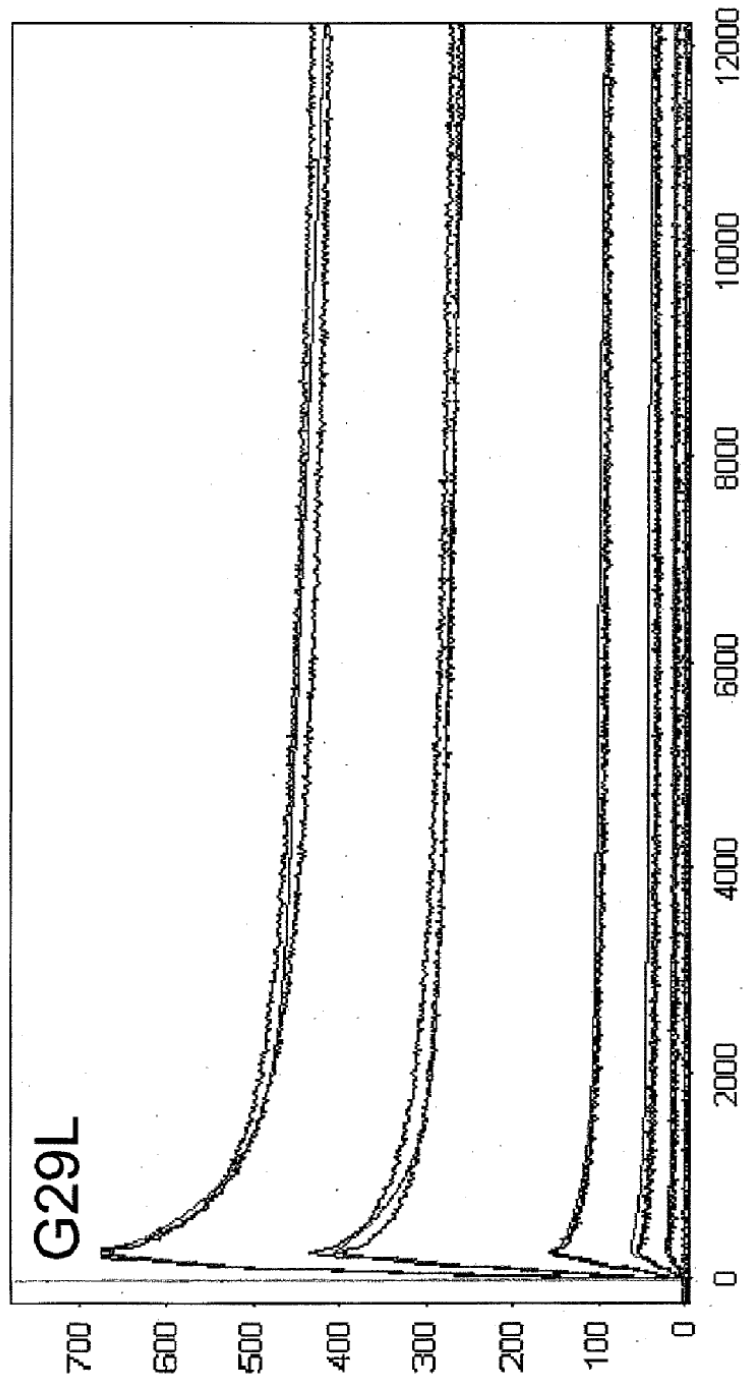


Figura 14A

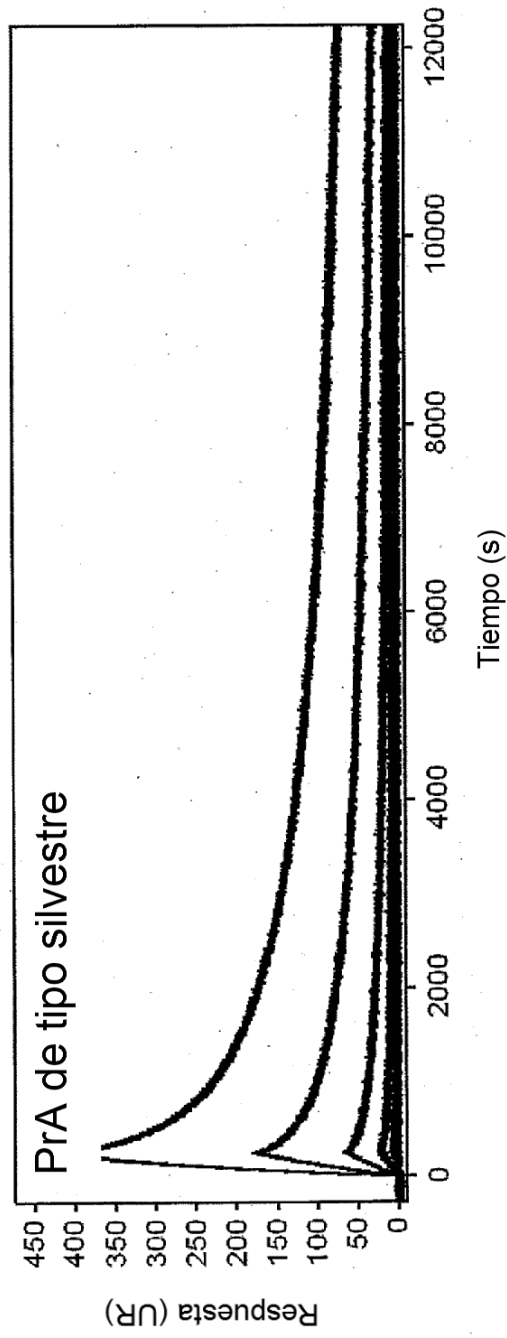


Figura 14B

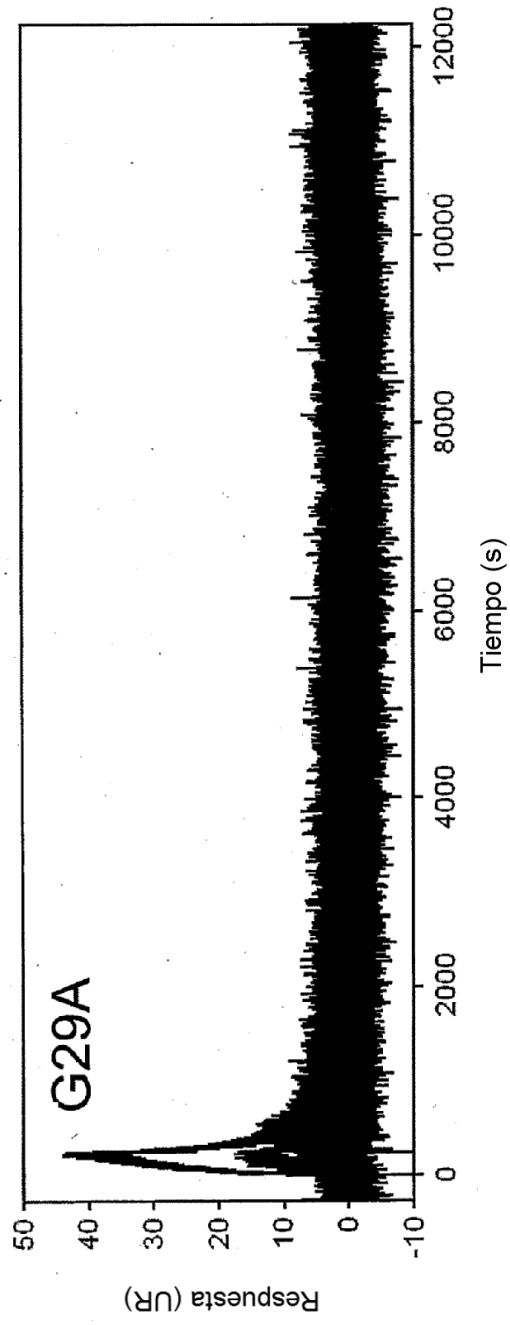


Figura 14C

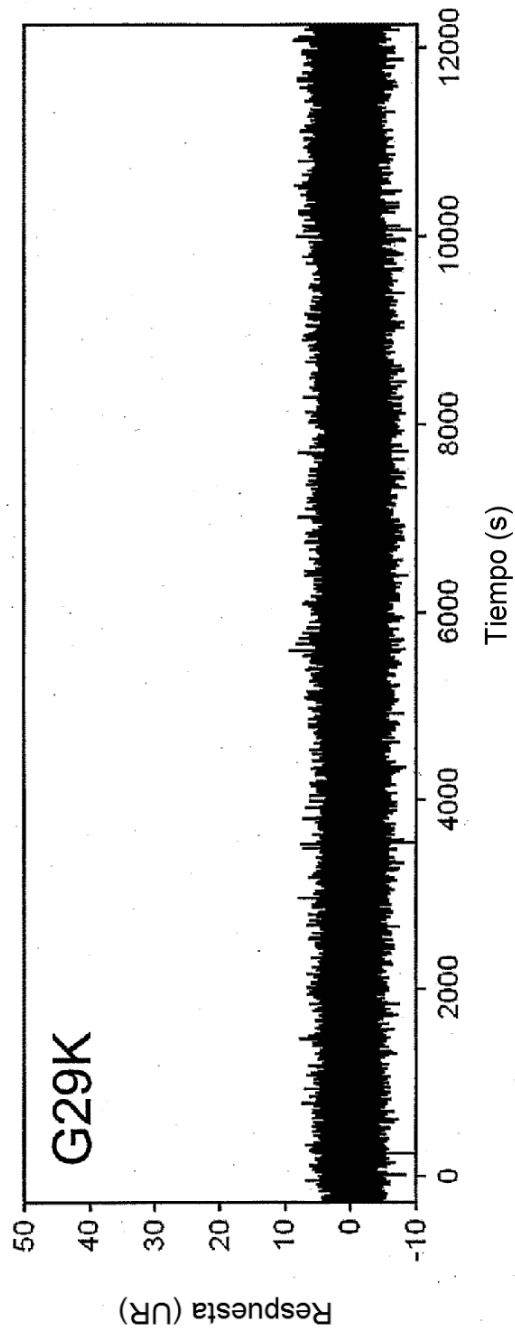


Figura 14D

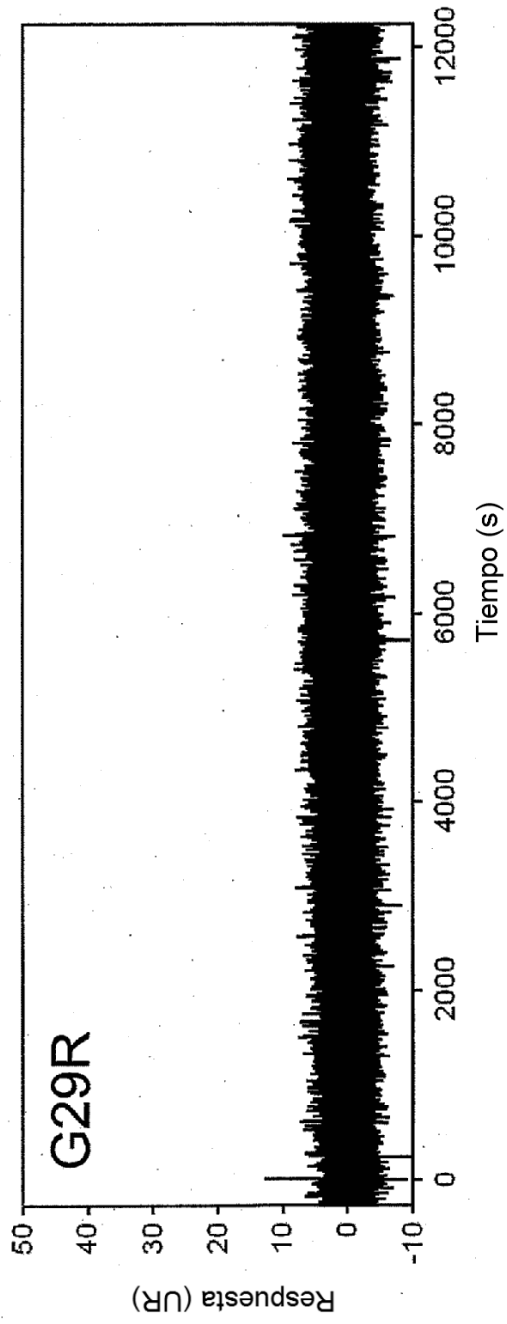


Figura 14E

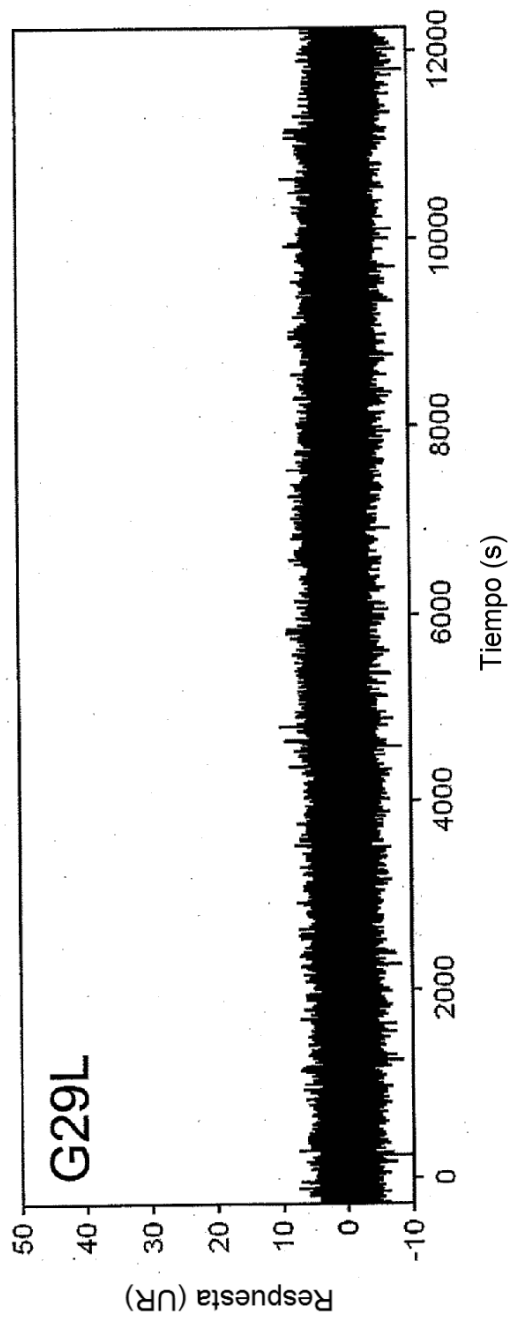


Figura 15A: Resultados de pulso Fc

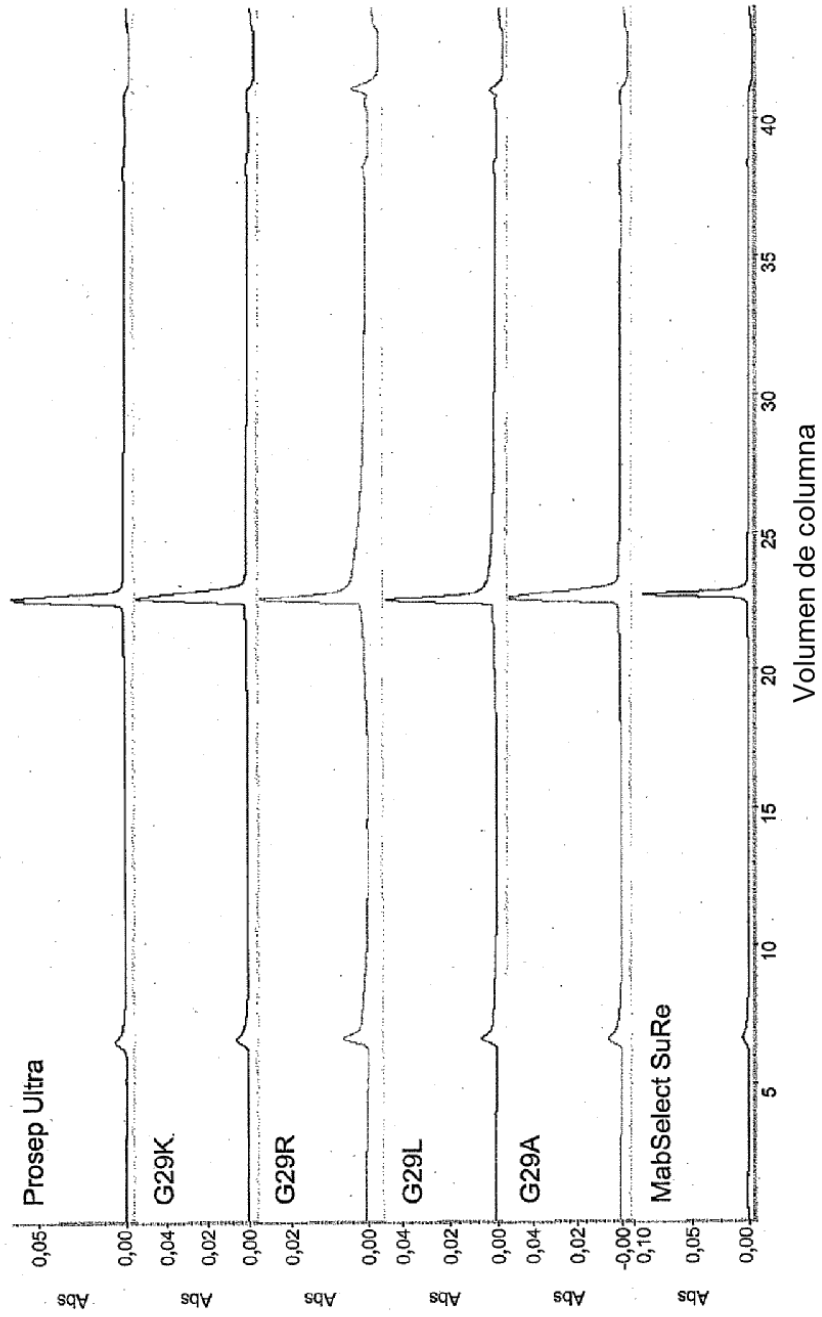


Figura 15B: Resultados de pulso F(ab)2

