

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 722**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 12171045 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2532672**

54 Título: **Matrices de cromatografía que incluyen nuevos ligandos basados en la proteína A de Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

08.06.2011 US 201161494701 P

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

08.06.2018

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**SPECTOR, SHARI;
SMITH, ROBERT;
ORLANDO, JOE y
BIAN, NANYING**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 671 722 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

Matrices de cromatografía que incluyen nuevos ligandos basados en la proteína A de *Staphylococcus aureus*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a matrices de cromatografía que incluyen ligandos basados en uno o más dominios de proteínas de unión a inmunoglobulinas tales como, la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) así como a métodos para usar las mismas.

Antecedentes

10 Los ligandos usados en cromatografía de afinidad confieren típicamente una alta selectividad para la molécula diana, dando de esta manera como resultado un alto rendimiento, alta pureza y purificación rápida y económica de las moléculas diana. Los reactivos y matrices de cromatografía basados en la Proteína A de *Staphylococcus aureus* han encontrado un uso amplio en el campo de la cromatografía de afinidad para la captura y purificación de anticuerpos y proteínas que contienen Fc, así como en métodos de detección de anticuerpos a escala analítica debido a su capacidad de unirse a IgG, sin afectar significativamente la afinidad de la inmunoglobulina para el antígeno.

15 De acuerdo con esto, se han desarrollado varios reactivos y medios que comprenden ligandos de Proteína A y están disponibles comercialmente, por ejemplo, ProSep®-vA High Capacity, ProSep® vA Ultra y ProSep® UltraPlus (MILLIPORE) y Protein A Sepharose™, MabSelect™, MabSelect Xtra™, MabSelect SuRe™ (GE HEALTHCARE), MabSelect SuRe™ LX y Poros MabCapture A™ (LIFE TECHNOLOGIES).

20 Con el fin de mantener la selectividad de los ligandos de cromatografía incluyendo los ligandos unidos a soportes sólidos tales como matrices de cromatografía unidas a SpA, las matrices deben limpiarse y se limpian típicamente en condiciones ácidas o alcalinas, p. ej., con hidróxido de sodio (NaOH). Por ejemplo, un proceso estándar que se usa para limpiar y restaurar la matriz es un protocolo alcalino de limpieza "in situ" ("cleaning-in-place") (CIP), que implica típicamente el tratamiento de la matriz con ligando unido con una concentración de NaOH que varía de 0,05M a 1M, dando como resultado un intervalo de pH de 12,7 a 14,0. Típicamente, la exposición de una matriz de cromatografía de afinidad a ciclos repetidos de CIP da como resultado una pérdida significativa de la capacidad de unión de la matriz para una molécula diana con el tiempo, lo que requiere el uso de una mayor cantidad a lo largo del proceso de ligandos frecuentemente muy costosos que se unen a las matrices. Esto es tanto poco rentable como indeseable ya que da como resultado que el proceso de purificación se vuelva más costoso, así como duradero.

Compendio de la invención

30 En la técnica se han descrito previamente matrices de cromatografía basadas en la Proteína A que parece que muestran una pérdida reducida de la capacidad de unión para una molécula diana después de tratamiento con condiciones alcalinas. Véase, p. ej., la Publicación de Patente U.S. No. 20100221844, que describe matrices de cromatografía de afinidad que incorporan los dominios B o Z de tipo salvaje (wt) de SpA con unión de múltiples puntos a la matriz, que muestran hasta el 95% de la capacidad de unión inicial incluso después de la exposición a NaOH 0,5M durante 5 horas o más. También, la Publicación de la Patente U.S. No. 20100048876 describe una matriz de cromatografía que incorpora el dominio C de tipo salvaje de SpA así como un dominio C que contiene una delección de los residuos de aminoácidos 3 a 6, que parece mostrar hasta el 95% de la capacidad de unión inicial después de la exposición a 0,5M durante aproximadamente 5 horas. Estos ligandos se inmovilizan a través de un único punto de unión dirigido por cisteína a la matriz. Además, se han descrito matrices de cromatografía que incorporan dominios de la Proteína A que contienen mutaciones en uno o más residuos de asparagina de la proteína, en el que las matrices parecen mostrar una pérdida reducida en la capacidad de unión respecto a SpA de tipo salvaje, después de la exposición a condiciones alcalinas y parece que están inmovilizados a través de la unión de un único punto a la matriz. Véase, p. ej., la Patente U.S. No. 6.831.161.

45 Aunque las matrices de cromatografía de afinidad mencionadas anteriormente parecen mostrar una pérdida reducida en la capacidad de unión para una molécula diana después de la exposición a condiciones cáusticas, algunas de estas matrices parecen mostrar un alto grado de fragmentación del ligando, p. ej., como se observa usando SDS-PAGE y/o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), después de la exposición a condiciones cáusticas. Dicha fragmentación es indeseable, ya que un alto grado de fragmentación del ligando da como resultado que estén presentes fragmentos más pequeños de los ligandos que son más difíciles de eliminar y separar de la molécula diana, incrementando de esta manera la probabilidad de que dichos fragmentos potencialmente inmunogénicos se co-purifiquen con la molécula diana terapéutica. Además, un alto grado de fragmentación da como resultado una pérdida incrementada en la capacidad de unión de la matriz para una molécula diana.

50 La presente invención proporciona matrices de cromatografía de afinidad en las que los ligandos se basan en uno o más dominios C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) como se define en la reivindicación 1 y métodos para usar las mismas. Estos ligandos y matrices muestran una fragmentación reducida durante el uso de la purificación, como se pone de manifiesto por técnicas de SDS-PAGE y/o SEC, respecto a algunos de los ligandos descritos previamente, convirtiéndolas de esta manera en candidatos más atractivos y económicos para uso en cromatografía de afinidad.

Se describen matrices de cromatografía de afinidad que incluyen uno o más dominios B de SpA que tienen una deleción o uno o más dominios Z de SpA que tienen una deleción, en el que el uno o más dominios están unidos a un soporte sólido.

5 También se describe una matriz de cromatografía de afinidad que incluye un ligando unido a un soporte sólido, en el que el ligando comprende uno o más dominios B de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA), en el que al menos un dominio B comprende una deleción de al menos 3 aminoácidos consecutivos del extremo N. Una matriz de cromatografía de afinidad según la presente invención comprende un ligando unido a un soporte sólido, en el que el ligando comprende uno o más dominios C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA), en el que al menos un dominio C comprende una deleción de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N.

10 También se describe una matriz de cromatografía de afinidad que comprende un ligando unido a un soporte sólido, en el que el ligando comprende uno o más dominios Z de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA), en el que al menos un dominio Z comprende una deleción de al menos 3 aminoácidos consecutivos del extremo N.

15 Además, se describe una matriz de cromatografía de afinidad que comprende un ligando unido a un soporte sólido, en el que el ligando comprende dos o más dominios B, dos o más dominios C o dos o más dominios Z, o cualquier combinación de dominios B, C y Z, en el que al menos uno del dominio B, C o Z comprende una deleción de al menos 3 aminoácidos consecutivos del extremo N.

En varias realizaciones según la presente invención, más de un sitio en cada ligando está unido a un soporte sólido (es decir, unión de múltiples puntos).

20 En varias realizaciones según la presente invención, el ligando presenta una fragmentación reducida, según se determina por SDS-PAGE o por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), respecto a su equivalente wt, después de la exposición del ligando o la matriz que contiene el ligando a NaOH 0,5M durante al menos 5 horas.

25 En algunas realizaciones según la presente invención, el ligando comprende una deleción de 3 aminoácidos del extremo N, una deleción de 4 aminoácidos del extremo o una deleción de 5 aminoácidos del extremo N, en el que más de un sitio en el ligando está unido a un soporte sólido, para formar de esta manera una matriz de cromatografía de afinidad.

En una realización particular, un ligando tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO:13-42, SEQ ID NO:55-84 y SEQ ID NO: 93-94.

30 Se describe un ligando que tiene la siguiente estructura: $[(X)_n, (Y)_m]_{n+m}$, en la que X representa un dominio B, un dominio Z o un dominio C de SpA, n representa el número de dominios que varía de cero a (m-1), Y representa un dominio C de SpA que tiene al menos 3 aminoácidos consecutivos delecionados del extremo N y m representa el número de dominios Y que varía de uno a ocho, en el que más de un sitio en el ligando está unido a un soporte sólido (p. ej., una matriz de cromatografía).

35 En algunas realizaciones según la presente invención, el ligando comprende dos dominios C de SpA, o un dominio B y uno C, o un dominio C y uno Z, en el que al menos un dominio B o al menos un dominio Z o al menos un dominio C incluye una deleción de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N. Se entiende que los distintos dominios pueden estar dispuestos en cualquier orden.

40 En otra realización, un ligando según la presente invención comprende tres dominios C o cualquier combinación de dominios B, C o Z en cualquier orden, en el que al menos un dominio C comprende una deleción de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N.

45 En otra realización más, un ligando según la presente invención comprende cuatro dominios C o cualquier combinación de dominios B, Z o C en cualquier orden, en el que al menos un dominio C comprende una deleción de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N.

En otra realización más, un ligando según la presente invención comprende cinco dominios C o cualquier combinación de dominios B, Z o C en cualquier orden, en el que al menos un dominio C comprende una deleción de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N.

50 En otra realización más, un ligando según la presente invención comprende seis dominios C o cualquier combinación de dominios B, Z o C en cualquier orden, en el que al menos un dominio C comprende una deleción de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una deleción de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N.

En otra realización más, un ligando según la presente invención comprende siete dominios C o cualquier combinación de dominios B, Z o C en cualquier orden, en el que al menos un dominio C comprende una delección de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una delección de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una delección de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N.

- 5 En una realización adicional, un ligando según la presente invención comprende ocho dominios C o cualquier combinación de dominios B, Z o C en cualquier orden, en el que al menos un dominio C comprende una delección de tres aminoácidos consecutivos del extremo N o una delección de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N o una delección de cinco aminoácidos consecutivos del extremo N.

Adicionalmente, en la presente memoria se proporcionan métodos para usar matrices de cromatografía de afinidad. De acuerdo con esto, se proporciona un método para purificar por afinidad una o más moléculas diana (p. ej., inmunoglobulinas o proteínas que contienen Fc) de una muestra, en el que el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una muestra que comprende una o más moléculas diana (p. ej., inmunoglobulinas o proteínas que contienen Fc); (b) poner en contacto la muestra con una matriz según la invención en condiciones tales que la una o más moléculas diana (p. ej., inmunoglobulinas o proteínas que contienen Fc) se unan a la matriz; y (c) recuperar la una o más moléculas diana (p. ej., inmunoglobulinas o proteínas que contienen Fc) unidas mediante la elución en condiciones adecuadas tales como, por ejemplo, un pH adecuado.

En algunas realizaciones, una matriz de cromatografía de afinidad según la presente invención retiene al menos el 95% de su capacidad de unión inicial para una molécula diana después de 5 horas o después de 10 horas o después de 15 horas o después de 20 horas o después de 25 horas o después de 30 horas de incubación en NaOH 0,5 M.

En una realización particular, una matriz de cromatografía de afinidad según la presente invención retiene al menos el 95% de su capacidad de unión inicial después de 5 horas de incubación en NaOH 0,5M.

En otra realización más, una matriz de cromatografía de afinidad según la presente invención retiene al menos el 95% de su capacidad de unión inicial para una molécula diana después de 25 horas de incubación en NaOH 0,1 M; al menos el 85% de su capacidad de unión inicial para una molécula diana después de 25 horas de incubación en NaOH 0,3M; o al menos el 65% de su capacidad de unión inicial para una molécula diana después de 25 horas de incubación en NaOH 0,5M.

Las inmunoglobulinas que son capaces de ser unidas por los distintos ligandos descritos en la presente memoria incluyen, p. ej., IgG, IgA e IgM, o cualquier proteína de fusión que comprende un anticuerpo y cualquier fragmento de anticuerpo, que sea capaz de unirse a SpA.

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

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona matrices de cromatografía de afinidad basadas en SpA que presentan una unión alterada (incrementada o disminuida) a una parte Fab de una inmunoglobulina comparado con los ligandos de SpA wt, mientras retienen la capacidad de unión a la parte Fc de la inmunoglobulina. En una realización, una matriz basada en SpA según la presente invención presenta una unión disminuida a una parte Fab de una inmunoglobulina comparado con SpA wt. En una realización particular, una matriz de cromatografía incorpora un ligando de SpA, que incluye una lisina en la posición 29, en lugar de una glicina (en el caso de los dominios B y C de SpA) o en lugar de una alanina (en el caso del dominio Z de SpA).

Las distintas realizaciones de la invención pueden combinarse conjuntamente a no ser que sea técnicamente incompatible.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa los alineamientos de las secuencias de aminoácidos para los dominios de unión a IgG de tipo salvaje (wt) de SpA así como el dominio Z, representado por las SEQ ID NO:1-6.

La FIG. 2 representa diagramas esquemáticos del plásmido pET11a que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el ligando del dominio Z dimérico con una mutación A29K, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:85 (control) y el plásmido pET11a que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el ligando del dominio Z dimérico con una mutación A29K, así como el segundo dominio que incluye una delección de 4 consecutivos del extremo N, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:78. Las construcciones de ligando incluyen además una secuencia de etiqueta His en el extremo 3'.

La Figura 3 es un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie para analizar el patrón de fragmentación de ligandos Z y C diméricos libres e inmovilizados con o sin empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 hrs. La descripción de los distintos Carriles del gel de SDS-PAGE es como sigue. Carril 1: marcador molecular; Carril 2: ligando del dominio Z

dimérico sin exposición cáustica (A29K sin deleciones, mostrado en la SEQ ID NO:85, que se usa como el control e incluye una etiqueta His); Carril 3: el control del ligando del dominio Z dimérico sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 4: el control del ligando del dominio Z dimérico inmovilizado en una resina de cromatografía de agarosa, que se somete a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 5: el ligando del dominio Z dimérico que tiene una deleción de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N del segundo dominio (A29K con el segundo dominio que tiene una deleción, mostrado en la SEQ ID NO:78 y una etiqueta His) sin exposición cáustica; Carril 6: el ligando del dominio Z dimérico de la SEQ ID NO:78 con una etiqueta His sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 7: el ligando del dominio Z dimérico de la SEQ ID NO:78 con una etiqueta His inmovilizado en una resina de cromatografía de agarosa y sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 8: ligando del dominio C dimérico sin deleciones usado como un control (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:92 que además tiene una etiqueta His) sin exposición cáustica; Carril 9: el control del ligando del dominio C dimérico sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 10: el ligando del dominio C dimérico inmovilizado en una resina de cromatografía de agarosa y sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 11: el ligando del dominio C dimérico que tiene una deleción del extremo N del segundo dominio (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:35 que además tiene una etiqueta His); Carril 12: el ligando del dominio C dimérico de la SEQ ID NO:35 más una etiqueta His sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; y Carril 13: el ligando del dominio C dimérico de la SEQ ID NO:35 más una etiqueta His inmovilizado en una resina de cromatografía de agarosa y sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas.

La Figura 4 es un cromatograma de un análisis SEC de los ligandos de Z y C diméricos resumidos en la descripción de la Figura 3 anterior. El eje de las x indica el tiempo de retención en minutos teniendo las moléculas más pequeñas un mayor tiempo de retención que el de una molécula mayor. El eje de las y representa la absorción UV a 280 nm en mAU. La evidencia de una fragmentación reducida para los ligandos de los dominios Z y C diméricos que tienen una deleción en el extremo N en el segundo dominio, después de un empape cáustico prolongado (es decir, empape en NaOH 0,5M durante 25 horas) se muestra mediante cajas en el cromatograma y la presencia de fragmentos más pequeños para los controles de los dominios Z y C diméricos se muestra mediante flechas.

La Figura 5 es un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie para analizar el patrón de fragmentación tanto de los ligandos del dominio Z pentamérico libres como inmovilizados con o sin empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas. La descripción de los distintos carriles del gel de SDS-PAGE es como sigue: Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: el ligando del dominio Z pentamérico tiene la mutación A29K y una deleción de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N de todos excepto el primer dominio, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:84, sin exposición cáustica; Carril 3: el ligando del dominio Z pentamérico de la SEQ ID NO:84 sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; Carril 4: el ligando del dominio Z pentamérico de la SEQ ID NO:84 inmovilizado en una resina de cromatografía de agarosa y sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas. Carril 5: el ligando del dominio Z pentamérico de la SEQ ID NO:91, usado como un control, que no se somete a empape cáustico; Carril 6: el control del ligando del dominio Z pentamérico sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas; y Carril 7: el control del ligando del dominio Z pentamérico inmovilizado en una resina de cromatografía de agarosa y sometido a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas. Además, los carriles 8, 9 y 10 se refieren a los resultados observados cuando se somete rSPA a un tratamiento similar, en el que el Carril 8 representa rSPA que no se somete a ningún empape cáustico; el Carril 9 representa rSPA sometida a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas y rSPA inmovilizada sometida a empape en NaOH 0,5M durante 25 horas. Las bandas representan la fragmentación, como se representa por flechas.

La Figura 6 es un cromatograma de un análisis SEC de los ligandos del dominio Z pentaméricos resumidos en la descripción de la Figura 5 anterior. El eje de las x indica el tiempo de retención en minutos teniendo las moléculas más pequeñas un mayor tiempo de retención que el de una molécula mayor. El eje de las y representa la absorción UV a 280 nm en mAU. La evidencia de una fragmentación reducida en el caso de los ligandos del dominio Z pentaméricos que tiene una deleción N-terminal en todos excepto en el primer dominio, después de un empape cáustico prolongado, se muestra mediante cajas en el cromatograma y la presencia de fragmentos más pequeños observada con el control del dominio Z pentamérico se muestra mediante una flecha que apunta a los fragmentos. Además, la cantidad extensa de fragmentación observada para rSPA también puede observarse usando SEC.

La Figura 7 es un cromatograma de un análisis SEC de los ligandos del dominio Z pentaméricos inmovilizados resumidos en la descripción de la Figura 5 anterior. El eje de las x indica el tiempo de retención en minutos teniendo las moléculas más pequeñas un mayor tiempo de retención que el de una molécula mayor. El eje de las y representa la absorción UV a 280 nm en mAU. La evidencia de una fragmentación reducida en el caso del ligando del dominio Z pentamérico inmovilizado que tiene una deleción N-terminal en el segundo dominio, después de un empape cáustico prolongado, se muestra mediante una caja en el cromatograma y la presencia de fragmentos más pequeños observada con el control del dominio Z pentamérico se muestra mediante una flecha que apunta a los fragmentos. Además, la cantidad extensa de fragmentación observada para rSPA inmovilizada también puede observarse usando SEC.

La Figura 8 es un cromatograma de un análisis SEC de los ligandos del dominio Z diméricos libres después de un empape cáustico prolongado, en el que los ligandos incluyen una deleción en el extremo N del primero (SEQ ID NO:87), de los dos primeros (SEQ ID NO:88), de los tres primeros (SEQ ID NO:69) o de los cuatro primeros (SEQ ID NO:78) del segundo dominio de los ligandos diméricos. El eje de las x indica el tiempo de retención en minutos

5 teniendo las moléculas más pequeñas un mayor tiempo de retención que el de una molécula mayor. El eje de las y representa la absorción UV a 280 nm en mAU. La evidencia de una fragmentación reducida en el caso de los ligandos diméricos que tienen los tres primeros o los cuatro primeros aminoácidos delecionados del extremo N del segundo dominio después de un empape cáustico prolongado se indica por cajas. La presencia de fragmentación observada después de un empape cáustico prolongado de los ligandos diméricos que no tienen deleciones de aminoácidos (SEQ ID NO:85) o el primer aminoácido delecionado o los primeros dos aminoácidos delecionados del extremo N del segundo dominio, se muestra mediante flechas que apuntan a la presencia de fragmentos en el cromatograma.

10 La Figura 9 compara las capacidades de unión retenidas de los ligandos pentaméricos del dominio C inmovilizados después de exposición cáustica repetida, en el que un ligando pentamérico incluye una deleción en el extremo N de 4 aminoácidos en cada dominio, la mutación G29K en cada dominio así como una alanina como el primer aminoácido en el pentámero (la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:93); y siendo el otro ligando pentamérico su equivalente wt con la mutación G29 K (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:95). El eje de las x representa el tiempo de exposición acumulativa de las matrices de cromatografía a NaOH 0,7M durante 16 ciclos de 30 mins cada uno. El eje de las y representa el porcentaje de capacidad de unión retenida.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona matrices de cromatografía de afinidad que incorporan ligandos basados en uno o más dominios C de SpA, en el que los ligandos, bien solos o cuando se inmovilizan en una matriz, muestran una fragmentación reducida durante el uso en procesos de purificación, respecto a los dominios wt correspondientes de SpA.

25 Los ligandos de cromatografía basados en SpA ejemplares descritos previamente incluyen, por ejemplo, los descritos en la Publicación de Patente U.S. No. 20100221844, que describe matrices de cromatografía que incorporan dominios B y Z de tipo salvaje de SpA, en los que más de un sitio en el ligando está unido a una matriz de cromatografía (es decir, unión de múltiples puntos); los descritos en la Publicación de Patente U.S. No. 20100048876, que discute ligandos de cromatografía basados en el dominio C wt de SpA, que son capaces de unirse a las partes Fab de algunos anticuerpos y se acoplan a un vehículo insoluble en un único sitio usando un grupo de acoplamiento terminal; y los descritos en la Patente U.S. No. 6.831.161, que discute ligandos de cromatografía alcalinos basados en SpA en los que se ha modificado uno o más residuos del aminoácido asparagina.

30 Como se ha discutido anteriormente, aunque estos ligandos presentan una pérdida reducida en la capacidad de unión después de la exposición a condiciones alcalinas, algunos de estos ligandos muestran fragmentación durante el uso en los procesos de purificación, p. ej., los ligandos descritos en la Publicación U.S. No. 20100221844, lo que es altamente indeseable. Los ligandos descritos en la presente memoria, por otra parte, son candidatos mucho más atractivos para la purificación de proteínas comparados con los ligandos descritos previamente, ya que muestran una fragmentación reducida después de la exposición a condiciones alcalinas durante los protocolos de regeneración y limpieza "in situ" (CIP) que se usan rutinariamente en los procesos de purificación de proteínas.

35 Con el fin de que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Las definiciones adicionales se muestran a lo largo de la descripción detallada.

40 I. Definiciones

45 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "SpA", "Proteína A" o "Proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refiere a una proteína con múltiples dominios de 42Kda aislada de la bacteria *Staphylococcus aureus*. SpA está unida a la pared celular bacteriana a través de su región de unión a la pared celular carboxi-terminal, referida como el dominio X. En la región amino-terminal, incluye cinco dominios de unión a inmunoglobulina, referidos como E, D, A, B y C (Sjodhal, Eur J Biochem. Sep 78(2):471-90 (1977); Uhlen et al., J Biol Chem. Feb 259(3):1695-702 (1984). Cada uno de estos dominios contiene aproximadamente 58 residuos de aminoácidos y comparten el 65-90% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

50 Cada uno de los dominios E, D, A, B y C de SpA posee distintos sitios de unión a Ig. Un sitio es para Fc γ (la región constante de la clase IgG de Ig) y el otro es para la parte Fab de determinadas moléculas de Ig (la parte de la Ig que es responsable del reconocimiento del antígeno). Se ha reportado que cada uno de los dominios contiene un sitio de unión a Fab. La parte que no se une a Ig de SpA está localizada en el extremo C y se designa como la región X o dominio X.

55 El dominio Z de SpA es un análogo preparado por ingeniería del dominio B de SpA e incluye una valina en lugar de una alanina en la posición 1 y una alanina en lugar de un residuo de glicina en la posición 29 (Nilsson, et al., Protein engineering, Vol. 1, No. 2, 107-113, 1987.).

La clonación del gen que codifica SpA se describe en la Patente U.S. No. 5.151.350.

La presente invención proporciona matrices de cromatografía de afinidad que incorporan ligandos basados en SpA, en el que los ligandos (tanto ligandos libres, así como inmovilizados) presentan una fragmentación reducida, como se observa por SDS-PAGE y SEC, después de los protocolos de regeneración y CIP que se usan rutinariamente durante el proceso de purificación de proteínas.

- 5 En algunos aspectos según la presente invención, un ligando de afinidad comprende uno o más dominios B o uno o más dominios Z y uno o más dominios C, o cualesquiera combinaciones de estos, en los que al menos un dominio C comprende una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N, o 4 aminoácidos consecutivos del extremo N o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2.

- 10 En algunas realizaciones según la presente invención, más de un sitio de un ligando de afinidad está unido a una matriz de cromatografía (es decir, unión de múltiples puntos). También se describe una matriz de cromatografía de afinidad que comprende uno o más dominios B de SpA unidos a una matriz de cromatografía, en el que más de un sitio del ligando está unido a la matriz y en el que al menos un dominio B tiene una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N o 4 aminoácidos consecutivos del extremo N o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2 de la secuencia del dominio B wt.

- 15 También se describe una matriz de cromatografía de afinidad que comprende uno o más dominios Z de SpA unidos a una matriz de cromatografía, en el que más de un sitio del ligando está unido a la matriz y en el que al menos un dominio Z tiene una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N o 4 aminoácidos consecutivos del extremo N o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2 de la secuencia del dominio Z wt.

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona una matriz de cromatografía de afinidad que comprende uno o más dominios C de SpA unidos a una matriz de cromatografía, en el que más de un sitio del ligando está unido a la matriz y en el que al menos un dominio C tiene una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N o 4 aminoácidos consecutivos del extremo N o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2 de la secuencia del dominio C wt.

- 25 En una realización particular, la presente invención proporciona un ligando de cromatografía de afinidad estable en condiciones alcalinas que incluye cinco dominios C de SpA, incluyendo cada dominio una mutación G29K, así como 4 aminoácidos delecionados del extremo N, empezando en la posición 1, e incluyendo la forma pentamérica una alanina extra como el primer aminoácido para facilitar el procesado homogéneo posterior a la traducción de la proteína.

- 30 En algunas realizaciones, los ligandos SpA descritos en la presente memoria incluyen además el residuo del aminoácido glicina en la posición 29 reemplazado por un residuo del aminoácido lisina (en el caso de los dominios B y C) o el residuo del aminoácido alanina en la posición 29 reemplazado por un residuo del aminoácido lisina (en el caso del dominio Z).

- 35 El término "molécula parental" o "equivalente de tipo salvaje (wt)" o "proteína wt" o "dominio wt", tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que se refiera a una proteína (SpA) o un dominio de una proteína (p. ej., dominios B, Z o C de SpA) correspondiente en su forma sustancialmente nativa, que se usa generalmente como un control en la presente memoria. Un control equivalente wt, tal y como se usa en la presente memoria, que corresponde a un dominio de SpA en su forma sustancialmente nativa puede incluir un cambio de aminoácido del dominio de SpA correspondiente para alterar la unión a Fab; sin embargo, es de otra manera idéntico en secuencia al dominio wt correspondiente. Los ligandos según la presente invención presentan una fragmentación reducida (en el caso tanto de las formas libres como inmovilizadas) respecto a sus equivalentes wt (es decir, completamente wt o que incluyen una mutación para alterar la unión a Fab), como se pone de manifiesto por los experimentos discutidos en los Ejemplos de la presente memoria. En varias realizaciones, el equivalente wt de un ligando basado en un dominio B o un dominio C es el dominio B wt de SpA o el dominio C wt de SpA, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO:3 y en la SEQ ID NO:4, respectivamente. En determinadas realizaciones, un equivalente wt de un ligando basado en un dominio Z es la secuencia de aminoácidos del dominio Z mostrada en la SEQ ID NO:6. En determinadas realizaciones, un equivalente wt de un dominio B, C o Z, es sustancialmente idéntico a la secuencia del dominio B, C o Z mencionado anteriormente, excepto una mutación en la posición 29 para alterar la unión a Fab del dominio. De acuerdo con esto, en determinadas realizaciones, un equivalente wt de un ligando basado en un dominio B incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:45 (G29K), un equivalente wt de un ligando basado en un dominio C incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:46 (G29K) y el equivalente wt de un ligando basado en un dominio Z incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:48 (A29K). Además, en el caso en el que un ligando incluya más de un dominio, el equivalente wt correspondiente incluirá el mismo número de dominios; sin embargo, puede incluir una mutación para alterar la unión a Fab. De acuerdo con esto, en determinadas realizaciones, un equivalente wt de un ligando del dominio C pentamérico según la presente invención incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 95 o en la SEQ ID NO:96.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos 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, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia (p. ej., secuencia parental), con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de la secuencia. Este algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la o las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, sobre la base de los parámetros del programa designados.
- El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, p. ej., por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas 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 por inspección visual (véase generalmente Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la 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 públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (accesible públicamente a través del servidor de internet del National Institutes of Health NCBI). Típicamente, los parámetros del programa por defecto pueden usarse para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos 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)).
- Tal y como se usan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio E", "dominio E de SpA" y "dominio E de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:1 o que está codificado por, p. ej., la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:7. El "dominio E" es un polipéptido de 51 aminoácidos que se pliega en una estructura de ovillo de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de residuos en la superficie de las hélices 1 y 2 o a Fab a través de residuos en la superficie de las hélices 2 y 3.
- Tal y como se usan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio D", "dominio D de SpA" y "dominio D de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:5 o que está codificado por, p. ej., la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:11. El "dominio D" es un polipéptido de 61 aminoácidos que se pliega en una estructura de ovillo de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de residuos en la superficie de las hélices 1 y 2 o a Fab a través de residuos en la superficie de las hélices 2 y 3.
- Tal y como se usan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio A", "dominio A de SpA" y "dominio A de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:2 o que está codificado por, p. ej., la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:8. El "dominio A" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de ovillo de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de residuos en la superficie de las hélices 1 y 2 o a Fab a través de residuos en la superficie de las hélices 2 y 3.
- Tal y como se usan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio B", "dominio B de SpA" y "dominio B de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:3 o que está codificado por, p. ej., la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:9. El "dominio B" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de ovillo de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de residuos en la superficie de las hélices 1 y 2 o a Fab a través de residuos en la superficie de las hélices 2 y 3.
- En algunas realizaciones, un ligando basado en un dominio B incluye una delección de tres aminoácidos del extremo N, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:13. En otras realizaciones, un ligando basado en un dominio B incluye una delección de cuatro aminoácidos del extremo N, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:28. En otra realización, un ligando basado en un dominio B incluye una delección de cinco aminoácidos del extremo N (secuencia no mostrada).
- Tal y como se usan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio C", "dominio C de SpA" y "dominio C de la Proteína A de *Staphylococcus aureus*", se refieren al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:4 o que está codificado por, p. ej., la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:10. El "dominio C" es un polipéptido de 58 aminoácidos que se pliega en una estructura de ovillo de tres hélices. Es capaz de unirse a Fc a través de residuos en la superficie de las hélices 1 y 2 o a Fab a través de residuos en la superficie de las hélices 2 y 3.

En algunas realizaciones, un ligando basado en un dominio C según la presente invención incluye una delección de tres aminoácidos del extremo N, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:14. En otras realizaciones, un ligando basado en un dominio C según la presente invención incluye una delección de cuatro aminoácidos del extremo N, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:29. En otra realización, un ligando basado en un dominio C según la presente invención incluye una delección de cinco aminoácidos del extremo N (secuencia no mostrada).

Tal y como se usan indistintamente en la presente memoria, los términos "dominio Z", "dominio Z de SpA" y "dominio Z de la Proteína A", se refieren al polipéptido de tres hélices de 58 aminoácidos que es una variante del dominio B de la proteína A. La secuencia de aminoácidos del dominio Z se muestra en la SEQ ID NO:6 y la secuencia de ácido nucleico se muestra en la SEQ ID NO: 12. Un dominio Z ejemplar se describe en Nilsson et al., Protein Engr., 1:107-113 (1987).

En algunas realizaciones, un ligando basado en un dominio Z incluye una delección de tres aminoácidos del extremo N, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:15. En otras realizaciones, un ligando basado en un dominio Z incluye una delección de cuatro aminoácidos del extremo N, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:30. En otra realización, un ligando basado en un dominio Z incluye una delección de cinco aminoácidos del extremo N (secuencia no mostrada).

En algunas realizaciones, más de un sitio de los ligandos descritos en la presente memoria se une a un soporte sólido (es decir, unión de múltiples puntos) y en el que los ligandos muestran una fragmentación reducida (en el caso tanto de ligandos libres como unidos) durante su uso en procesos de purificación, como se pone de manifiesto por SDS-PAGE o SEC.

El término "fragmentación reducida", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una disminución en el número y/o intensidad de fragmentos de un ligando, como se observa en un gel de SDS-PAGE o por SEC, respecto a un equivalente wt del ligando, después de la exposición de la molécula de ligando libre o la molécula de ligando inmovilizada en un soporte sólido, a condiciones alcalinas durante el proceso de purificación. En algunas realizaciones, el ligando se inmoviliza en un soporte sólido a través de unión de múltiples puntos. La fragmentación se detecta habitualmente por la presencia de bandas moleculares menores respecto a la molécula intacta en un gel de SDS-PAGE o como picos distintos que tienen diferentes tiempos de retención en un cromatograma de SEC.

Los ligandos de SpA según la presente invención presentan una fragmentación reducida, que puede detectarse como sigue. Por ejemplo, el ligando libre puede exponerse directamente a NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M durante 25 hrs, seguido de un ajuste del pH a 7,0 y pueden analizarse posteriormente por SDS-PAGE o SEC usando protocolos estándar. Alternativamente, un ligando inmovilizado en una matriz de cromatografía puede exponerse a NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M durante 25 hrs. El sobrenadante cáustico se separa posteriormente de la matriz (p. ej., una resina) y se neutraliza hasta pH 7. Este sobrenadante puede analizarse por SDS-PAGE o por SEC usando protocolos estándar. En el caso de SDS-PAGE, la intensidad óptica relativa de los fragmentos puede observarse visualmente y compararse con un control adecuado (p. ej., un dominio wt de SpA o un dominio de SpA que contiene una mutación en la posición 29, como se describe en la presente memoria). En el caso de SEC, la intensidad de los picos relativa puede observarse y compararse con un control adecuado (p. ej., un dominio wt de SpA o un dominio de SpA que contiene una mutación en la posición 29, como se describe en la presente memoria).

Un proceso de purificación típico usando una matriz de cromatografía de afinidad implica la regeneración de la matriz después de cada ciclo de uso empleando una disolución ácida o alcalina, siendo preferible la última. Además, los procesos típicos también implican etapas de CIP, que emplean el uso de una disolución ácida o alcalina para limpiar la matriz, siendo preferibles las disoluciones alcalinas. De acuerdo con esto, se espera que una matriz de cromatografía de afinidad esté expuesta a varios ciclos de regeneración y etapas de CIP en su vida útil, dando como resultado de esta manera una pérdida significativa de la capacidad de unión para una molécula diana a lo largo del tiempo.

Las matrices de cromatografía que incorporan los ligandos según la presente invención son estables en condiciones alcalinas además de presentar una fragmentación reducida durante su uso en los procesos de purificación, ya que muestran una pérdida reducida de la capacidad de unión para una molécula diana a lo largo del tiempo, después de una exposición prolongada a condiciones alcalinas durante las etapas de regeneración y CIP.

El término "estable en condiciones alcalinas", "estabilidad en condiciones alcalinas", "estable en condiciones cáusticas" o "estabilidad en condiciones cáusticas", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere generalmente a la capacidad de un ligando de afinidad según la presente invención, bien solo o cuando se inmoviliza en una matriz de cromatografía, de soportar los ciclos repetidos de regeneración y CIP usando lavados alcalinos sin perder su capacidad de unión inicial. En general, se asume que una matriz por sí misma, en la que se inmoviliza un ligando según la invención, contribuye en menos de un 5% al cambio en la estabilidad después de haberse empapado en NaOH 0,5M durante hasta 30 horas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ligandos de afinidad según la invención son capaces de soportar el lavado alcalino convencional durante un periodo de tiempo prolongado, lo que hace que los ligandos sean candidatos atractivos, especialmente para la purificación a gran

escala rentable de inmunoglobulinas y proteínas que contienen Fc, muchas de los cuales son moléculas terapéuticas.

En algunas realizaciones, la estabilidad en condiciones alcalinas se refiere a la capacidad de un ligando según la presente invención o una matriz que incorpora un ligando según la presente invención, de retener al menos el 65% o al menos el 70% o al menos el 75% o al menos el 80% o al menos el 85% o al menos el 90% o al menos el 95% de su capacidad de unión inicial después de 5 horas o después de 10 horas o después de 15 horas o después de 20 horas o después de 25 horas o después de 30 horas de incubación en NaOH 0,05M, NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M. En otra realización, la estabilidad en condiciones alcalinas se refiere a una disminución de la capacidad de unión inicial del ligando en menos de un 70% o menos de un 60% o menos de un 50% o menos de un 40% o menos de un 30% incluso después de tratamiento con NaOH 0,05M, NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M durante 5 horas o 7,5 horas o 10 horas o 15 horas o 20 horas o 25 horas o 30 horas. En una realización particular, una matriz de cromatografía que incorpora un ligando según la presente invención retiene hasta el 95% de su capacidad de unión inicial después de exposición a NaOH 0,5M durante 5 horas. En otra realización, una matriz de cromatografía que incorpora un ligando según la presente invención retiene hasta el 95% de su capacidad de unión inicial después de exposición a NaOH 0,1M durante 25 horas. En otra realización más, una matriz de cromatografía que incorpora un ligando según la presente invención retiene hasta el 85% de su capacidad de unión inicial después de exposición a NaOH 0,3M durante 25 horas. En una realización adicional, una matriz de cromatografía que incorpora un ligando según la presente invención retiene hasta el 65% de su capacidad de unión inicial después de exposición a NaOH 0,5M durante 25 horas.

En algunas realizaciones, las matrices de cromatografía basadas en SpA según la presente invención presentan una estabilidad en condiciones alcalinas incrementada o mejorada comparado con matrices que incluyen dominios de SpA de tipo salvaje. Sin embargo, en otras realizaciones, las matrices de cromatografía basadas en SpA según la presente invención no son más estables en condiciones alcalinas que las matrices que incluyen equivalentes de tipo salvaje de los ligandos. Uno de dichos ejemplos es un ligando basado en el dominio C pentamérico de SpA que no es más estable en condiciones alcalinas que su equivalente de dominio C pentamérico de tipo salvaje. Se entiende que, en determinados casos, tanto los dominios de SpA de tipo salvaje como las variantes pueden incluir una mutación G29K para reducir la unión a Fab; sin embargo, dicha mutación no tiene un efecto en sí misma en la estabilidad en condiciones alcalinas (datos no mostrados).

La estabilidad en condiciones alcalinas puede medirse fácilmente por un experto en la técnica usando experimentación rutinaria y/o como se describe en la presente memoria.

El término "capacidad de unión inicial", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de una molécula diana (p. ej., una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) que puede capturarse por una unidad de volumen de una matriz de cromatografía de afinidad (es decir, una matriz que incluye un ligando de afinidad) antes de la exposición de la matriz a condiciones alcalinas.

En algunas realizaciones según la presente invención, las matrices de cromatografía de afinidad que incluyen los ligandos descritos en la presente memoria (es decir, que contienen uno o más dominios C de SpA que incluyen delecciones N-terminales descritas en la presente memoria) presentan menos de un 5% o menos de un 6% o menos de un 7% o menos de un 8% o menos de un 9% o menos de un 10% o menos de un 12% o menos de un 15% o menos de un 17% o menos de un 20% o menos de un 25% o menos de un 30% de pérdida de la capacidad de unión inicial de una molécula diana respecto a una matriz de cromatografía de afinidad que contiene un equivalente wt del dominio de SpA como se describe en la presente memoria, después de la exposición prolongada a condiciones cáusticas. En algunas realizaciones, las matrices de cromatografía de afinidad según la presente invención retienen al menos el 95% o al menos el 90% o al menos el 85% o al menos el 80% o al menos el 75% o al menos el 70% de la capacidad de unión inicial de una molécula diana respecto a una matriz de cromatografía de afinidad que contiene un dominio wt de SpA correspondiente, después de la exposición prolongada a condiciones cáusticas. Sin embargo, en algunas otras realizaciones, las matrices de cromatografía según la presente invención presentan una capacidad de unión similar a las matrices que contienen un equivalente wt del ligando después de la exposición prolongada a condiciones cáusticas. Una de dichas matrices de cromatografía ejemplares incluye un ligando que incluye 5 o más dominios C de SpA, en la que cada dominio incluye 4 aminoácidos delecionados del extremo N en la que el ligando no es más estable en condiciones alcalinas que su dominio C equivalente de tipo salvaje. Tanto la forma de delección como el equivalente de tipo salvaje puede contener una mutación G29K. Además, en varias realizaciones descritas en la presente memoria, los ligandos SpA pueden incluir además un único aminoácido tal como una alanina, una valina o una glicina, en el extremo N de solo el primer dominio en un multímero, en el que el aminoácido extra facilita el procesamiento homogéneo posterior a la traducción.

La capacidad de unión de un ligando de cromatografía de afinidad para una molécula diana puede medirse fácilmente usando métodos conocidos en la técnica y aquellos descritos en la presente memoria, p. ej., como se describe en la Publicación de Patente U.S. No. 20100221844.

El término "cromatografía", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una técnica de separación dinámica que separa una molécula diana de interés (p. ej., una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) de otras moléculas en la mezcla y permite aislarla. Típicamente, en un método de cromatografía, una fase móvil (líquido

o gas) transporta una muestra que contiene la molécula diana de interés a lo largo o a través de un medio de fase estacionaria (normalmente sólido). Las diferencias en el reparto o afinidad respecto a la fase estacionaria separan las diferentes moléculas mientras la fase móvil porta las diferentes moléculas fuera a diferentes tiempos.

5 El término "cromatografía de afinidad", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un modo de cromatografía en el que una molécula diana que se va a separar se aísla por su interacción con una molécula (p. ej., un ligando de cromatografía estable en condiciones alcalinas) que interacciona específicamente con la molécula diana. En una realización, la cromatografía de afinidad implica la adición de una muestra que contiene una molécula diana (p. ej., una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) a un soporte sólido que contiene en él un ligando basado en SpA, como se describe en la presente memoria.

10 El término "cromatografía de afinidad de Proteína A", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la separación o aislamiento de sustancias usando Proteína A o ligandos basados en SpA, tales como los descritos en la presente memoria, en la que el ligando SpA o Proteína A se inmoviliza, p. ej., en un soporte sólido. Los ejemplos de medios/resinas de cromatografía de afinidad de Proteína A conocidos en la técnica incluyen aquellos que tienen a la Proteína A inmovilizada en un núcleo de vidrio con poro controlado, p.ej., medios /resinas PROSEP A™ y PROSEP vA™ (MILLIPORE); aquellos que tienen a la Proteína A inmovilizada en una fase sólida de poliestireno, p. 15 ej., los medios/resinas POROS 50A™ y Poros MabCapture A™ (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.); y aquellos que tienen a la Proteína A inmovilizada en un soporte sólido de agarosa, p. ej., los medios o resinas rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o MABSELECT™ (GE HEALTHCARE).

20 Además de las matrices mencionadas anteriormente, la Proteína A también puede inmovilizarse en un polímero entrecruzado hidrofílico. Véase, p. ej., la Publicación de Patente U.S. No. 20080210615, que describe polímeros entrecruzados hidrofílicos ejemplares. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se contempla que los ligandos englobados por la presente invención pueden inmovilizarse en polímeros entrecruzados hidrofílicos, tales como los descritos en la Publicación de Patente U.S. No. 20080210615.

25 El término "matriz de afinidad" o "matriz de cromatografía de afinidad", tal y como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a un soporte cromatográfico al que se une un ligando de cromatografía de afinidad (p. ej., SpA o un dominio de esta). El ligando es capaz de unirse a una molécula de interés a través de una interacción de afinidad (p. ej., una inmunoglobulina o una proteína que contiene Fc) que se va a purificar o retirar de una mezcla. Las matrices de cromatografía de afinidad basadas en la Proteína A ejemplares para uso en cromatografía de afinidad basada en la Proteína A que son conocidas en la técnica incluyen Proteína A inmovilizada en un núcleo 30 de vidrio con poro controlado, p. ej., las resinas PROSEP A™ y PROSEP vA™, Alta Capacidad, Ultra y PROSEP Ultra Plus (MILLIPORE); Proteína A inmovilizada en una fase sólida de poliestireno, p. ej., la resina POROS 50A™ y Poros MabCapture A™ (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.); o Proteína A inmovilizada en una fase sólida de agarosa, por ejemplo, la resina rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ o MABSELECT™ (GE HEALTHCARE).

35 El término "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usados indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consisten en dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercadena, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígenos. El término "inmunoglobulina de cadena única" o "anticuerpo de cadena única" (usados indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de 40 dos cadenas polipeptídicas que consisten en una cadena pesada y una ligera, estando estabilizadas dichas cadenas, por ejemplo, por conectores peptídicos intercadena, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígenos. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (p. ej., que comprende 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, por una lámina β plegada y/o enlace disulfuro intercadena. Los dominios se refieren adicionalmente en la presente memoria como "constante" o "variable", sobre la base de la ausencia relativa de variación en la secuencia en los dominios de 45 los miembros de las distintas clases en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa en los dominios de los miembros de las distintas clases en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpo o polipéptido se refieren frecuentemente de manera indistinta en la técnica como "regiones" de anticuerpo o polipéptido. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de anticuerpos se refieren de manera indistinta como "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de anticuerpos se refieren de manera indistinta como "regiones 50 constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de anticuerpos se refieren de manera indistinta como "regiones variables de cadena ligera", "dominios variables de cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de anticuerpos se refieren de manera indistinta como "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

60 Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, los anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o los anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimérica o multimérica. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos pueden obtenerse mediante tratamiento químico o enzimático de un

anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. Los fragmentos también pueden obtenerse por medios recombinantes. Los fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv.

5 El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una porción de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a un antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) para la unión al antígeno (es decir, unión específica). Los fragmentos de unión pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por la escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, cadenas únicas y anticuerpos de cadena única.

También están englobadas las proteínas de fusión que incluyen un anticuerpo o fragmento de este como una parte de la proteína de fusión.

10 Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico", usados indistintamente en la presente memoria, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen ADN mono, bi o tricatenario, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. El núcleo del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN) o azúcares y grupos fosfato modificados o sustituidos. Además, un polinucleótido bicatenario puede obtenerse a partir del producto polinucleótido monocatenario de síntesis química bien sintetizando la cadena complementaria e hibridando las cadenas en condiciones apropiadas o sintetizando la cadena complementaria *de novo* usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado. Una molécula de ácido nucleico puede tener diferentes formas, p. ej., un gen o fragmento
15 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 ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos conectores tales como fluororibosa y tioato y ramificaciones de nucleótidos. Tal y como se usa en la presente memoria, "ADN" o "secuencia de nucleótidos" incluye no solo las bases A, T, C y G, sino que también incluye cualquiera de sus análogos o formas modificadas de estas bases, tales como nucleótidos metilados, modificaciones internucleótido tales como uniones no cargadas y tioatos, el uso de análogos de azúcares y estructuras de núcleo 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, como se describe en la presente memoria.

30 El término "unión a Fc", "se une a una porción Fc" o "unión a una porción Fc" se refiere a la capacidad de un ligando de afinidad descrito en la presente memoria, de unirse a la parte constante (Fc) de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un ligando según la presente invención se une a una porción Fc de un anticuerpo (p. ej., IgG1, IgG2 o IgG4 humana) con una afinidad de al menos 10⁻⁷ M o al menos 10⁻⁸ M o al menos 10⁻⁹ M.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "unión a Fab" o "unión a una porción Fab" se refiere a la capacidad de un ligando de afinidad descrito en la presente memoria, de unirse a una región Fab de un anticuerpo o una molécula de inmunoglobulina. El término "unión reducida a una porción Fab" se refiere a cualquier disminución en la unión a una porción Fab (o F(ab)₂) de una molécula de inmunoglobulina por un ligando basado en SpA según la presente invención respecto a un control (p. ej., un dominio wt de SpA), en el que el ligando incluye además una mutación en uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, un ligando según la presente invención y su equivalente wt (usado como un control) incluye el residuo de glicina en la posición 29 reemplazado con un aminoácido distinto de alanina o triptófano. En una realización particular, un ligando según la presente invención incluye un residuo de lisina en la posición 29. En una realización particular, la unión a una porción Fab de una molécula de inmunoglobulina por un ligando descrito en la presente memoria es indetectable usando técnicas convencionales en la técnica y aquellas descritas en la presente memoria. La unión a una molécula de
40 inmunoglobulina puede detectarse usando técnicas muy conocidas incluyendo aquellas descritas en la presente memoria e incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, cromatografía de afinidad y análisis por resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, una proteína de unión a inmunoglobulina englobada por la presente invención se une a una molécula de inmunoglobulina con una afinidad de al menos 10⁻¹⁰ M.

50 El término "extremo N", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al extremo amino de la secuencia de aminoácidos de un dominio de SpA, empezando en la posición 1 o en la posición 2 de la secuencia de aminoácidos de cada uno de los dominios, como se representa en la Figura 1. Sin embargo, se entiende que el primer aminoácido en una secuencia puede estar precedido por un residuo del aminoácido metionina u otro aminoácido para facilitar el procesamiento homogéneo posterior a la traducción de la proteína, tal como, por ejemplo, una alanina, una glicina o una valina. Los ligandos SpA descritos en la presente memoria incluyen una delección de al menos 3 o al menos 4 o al menos 5 aminoácidos consecutivos del extremo N (empezando en la posición 1 o en la
55 posición 2 de las secuencias de aminoácidos de los dominios B, C o Z mostradas en la Figura 1) de un dominio de SpA. En otras palabras, dichos ligandos incluyen una delección de los aminoácidos consecutivos 1 a 3 o de los aminoácidos consecutivos 1 a 4 o de los aminoácidos consecutivos 1 a 5 etc., de los dominios de SpA B, Z o C o dichos ligandos incluyen una delección de los aminoácidos consecutivos 2 a 4 o de los aminoácidos consecutivos 2 a 5 o de los aminoácidos consecutivos 2 a 6 etc., de los dominios de SpA B, Z o C (las secuencias de aminoácidos de los dominios B, C y Z wt se representan en la Figura 1, que están modificadas para incluir delecciones del extremo
60

N). En una realización particular, un ligando según la presente invención incluye 5 dominios C, incluyendo cada dominio una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1.

5 La secuencia de aminoácidos del dominio B de SpA que contiene una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N se representa en la SEQ ID NO: 13 y la que contiene una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N se representa en la SEQ ID NO: 28. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos del dominio C de SpA que contiene una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N se representa en la SEQ ID NO: 14, y la que contiene una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N se representa en la SEQ ID NO: 29. Además, la secuencia de aminoácidos del dominio Z que contiene una delección de 3 aminoácidos consecutivos del extremo N se representa en la SEQ ID NO: 15, y la que contiene una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N se representa en la SEQ ID NO: 30.

15 En general, en el caso de las formas multiméricas de los ligandos basados en SpA descritas en la presente memoria, las secuencias de aminoácidos de las formas monoméricas de los ligandos están simplemente repetidas, según sea deseable. Sin embargo, debe indicarse que, en el caso de algunas formas multiméricas de los ligandos según la presente invención, no es necesario que todos los dominios tengan una delección del extremo N. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ligandos no contienen una delección en el extremo N del primer dominio en la forma multimérica del ligando; sin embargo, los dominios posteriores en el ligando contienen una delección de al menos 3 aminoácidos consecutivos del extremo N o de al menos 4 aminoácidos consecutivos del extremo N o de al menos 5 aminoácidos consecutivos del extremo N.

20 Los ligandos basados en SpA según la presente invención presentan propiedades superiores e inesperadas, es decir, fragmentación reducida durante su uso en los procesos de purificación, como se pone de manifiesto en los Ejemplos de la presente memoria. Notablemente, las enseñanzas en la técnica anterior parecen desaconsejar la motivación de preparar y usar dichos ligandos. Por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. No. 20100048876, discute un ligando que incluye una delección en los residuos de aminoácidos 3 a 6 del dominio C de SpA; sin embargo, sobre la base de las enseñanzas de esta publicación (véase, p. ej., la Figura 2 de la Publicación de Patente U.S. No. 20100048876), parece que el mutante de delección descrito en ella se comporta pobremente respecto a la retención de la capacidad de unión respecto al dominio C wt de SpA, durante una exposición cáustica prolongada. De acuerdo con esto, sobre la base de las enseñanzas de esta referencia, sería menos deseable usar un mutante de delección de un dominio C de SpA, cuando pierde más capacidad de unión con el tiempo, respecto a su equivalente de tipo salvaje.

30 Por motivos de conveniencia, las varias secuencias referenciadas a lo largo de la solicitud se resumen en la Tabla I siguiente.

Tabla I

Breve descripción de la secuencia	SEQ ID
AA - Aminoácido; NA - Ácido Nucleico; Δ -que tiene una delección	NO:
AA del dominio E wt	1
AA del dominio A wt	2
AA del dominio B wt	3
AA del dominio C wt	4
AA del dominio D wt	5
AA del dominio Z	6
NA del dominio E wt	7
NA del dominio A wt	8
NA del dominio B wt	9
NA del dominio C wt	10

ES 2 671 722 T3

Breve descripción de la secuencia	SEQ ID
AA - Aminoácido; NA - Ácido Nucleico; Δ -que tiene una deleción	NO:
NA del dominio D wt	11
NA del dominio Z	12
monómero del dominio B Δ 3 AA	13
monómero del dominio C Δ 3 AA	14
monómero del dominio Z Δ 3 AA	15
dímero del dominio B Δ 3 AA-teniendo ambos dominios la deleción	16
dímero del dominio C Δ 3 AA-teniendo ambos dominios la deleción	17
dímero del dominio Z Δ 3 AA-teniendo ambos dominios la deleción	18
dímero del dominio B Δ 3 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción	19
dímero del dominio C Δ 3 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción	20
dímero del dominio Z Δ 3 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción	21
pentámero del dominio B Δ 3 AA-todos los dominios tienen la deleción	22
pentámero del dominio C Δ 3 AA-todos los dominios tienen la deleción	23
pentámero del dominio Z Δ 3 AA-todos los dominios tienen la deleción	24
pentámero del dominio B Δ 3 AA-el primer dominio no tiene la deleción	25
pentámero del dominio C Δ 3 AA-el primer dominio no tiene la deleción	26
pentámero del dominio Z Δ 3 AA-el primer dominio no tiene la deleción	27
monómero del dominio B Δ 4 AA	28
monómero del dominio C Δ 4 AA	29
monómero del dominio Z Δ 4 AA	30
dímero del dominio B Δ 4 AA-teniendo ambos dominios la deleción	31
dímero del dominio C Δ 4 AA-teniendo ambos dominios la deleción	32
dímero del dominio Z Δ 4 AA-teniendo ambos dominios la deleción	33
dímero del dominio B Δ 4 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción	34
dímero del dominio C Δ 4 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción	35

ES 2 671 722 T3

Breve descripción de la secuencia	SEQ ID
AA - Aminoácido; NA - Ácido Nucleico; Δ -que tiene una deleción	NO:
dímero del dominio Z Δ 4 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción	36
pentámero del dominio B Δ 4 AA-todos los dominios tienen la deleción	37
pentámero del dominio C Δ 4 AA-todos los dominios tienen la deleción	38
pentámero del dominio Z Δ 4 AA-todos los dominios tienen la deleción	39
pentámero del dominio B Δ 4 AA-el primer dominio no tiene la deleción	40
pentámero del dominio C Δ 4 AA-el primer dominio no tiene la deleción	41
pentámero del dominio Z Δ 4 AA-el primer dominio no tiene la deleción	42
AA del dominio E wt no Fab (G29K)	43
AA del dominio A wt no Fab (G29K)	44
AA del dominio B wt no Fab (G29K)	45
AA del dominio C wt no Fab (G29K)	46
AA del dominio D wt no Fab (G29K)	47
AA del dominio Z no Fab (A29K)	48
NA del dominio E wt no Fab (G29K)	49
NA del dominio A wt no Fab (G29K)	50
NA del dominio B wt no Fab (G29K)	51
NA del dominio C wt no Fab (G29K)	52
NA del dominio D wt no Fab (G29K)	53
NA del dominio Z no Fab (A29K)	54
monómero del dominio B Δ 3 AA no Fab (G29K)	55
monómero del dominio C Δ 3 AA no Fab (G29K)	56
monómero del dominio Z Δ 3 AA no Fab (A29K)	57
dímero del dominio B Δ 3 AA-teniendo ambos dominios la deleción no Fab (G29K)	58
dímero del dominio C Δ 3 AA-teniendo ambos dominios la deleción no Fab (G29K)	59
dímero del dominio Z Δ 3 AA-teniendo ambos dominios la deleción no Fab (A29K)	60

ES 2 671 722 T3

Breve descripción de la secuencia	SEQ ID
AA - Aminoácido; NA - Ácido Nucleico; Δ -que tiene una deleción	NO:
dímero del dominio B Δ 3 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción no Fab (G29K)	61
dímero del dominio C Δ 3 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción no Fab (G29K)	62
dímero del dominio Z Δ 3 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción no Fab (A29K)	63
pentámero del dominio B Δ 3 AA-todos los dominios tienen la deleción no Fab (G29K)	64
pentámero del dominio C Δ 3 AA-todos los dominios tienen la deleción no Fab (G29K)	65
pentámero del dominio Z Δ 3 AA-todos los dominios tienen la deleción no Fab (A29K)	66
pentámero del dominio B Δ 3 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (G29K)	67
pentámero del dominio C Δ 3 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (G29K)	68
pentámero del dominio Z Δ 3 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (A29K)	69
monómero del dominio B Δ 4 AA no Fab (G29K)	70
monómero del dominio C Δ 4 AA no Fab (G29K)	71
monómero del dominio Z Δ 4 AA no Fab (A29K)	72
dímero del dominio B Δ 4 AA-teniendo ambos dominios la deleción no Fab (G29K)	73
dímero del dominio C Δ 4 AA-teniendo ambos dominios la deleción no Fab (G29K)	74
dímero del dominio Z Δ 4 AA-teniendo ambos dominios la deleción no Fab (A29K)	75
dímero del dominio B Δ 4 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción no Fab (G29K)	76
dímero del dominio C Δ 4 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción no Fab (G29K)	77
dímero del dominio Z Δ 4 AA-solo el segundo dominio tiene la deleción no Fab (A29K)	78
pentámero del dominio B Δ 4 AA-todos los dominios tienen la deleción no Fab (G29K)	79
pentámero del dominio C Δ 4 AA-todos los dominios tienen la deleción no Fab (G29K)	80
pentámero del dominio Z Δ 4 AA-todos los dominios tienen la deleción no Fab (A29K)	81
pentámero del dominio B Δ 4 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (G29K)	82
pentámero del dominio C Δ 4 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (G29K)	83
pentámero del dominio Z Δ 4 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (A29K)	84
dímero del dominio Z no Fab (A29K)	85

Breve descripción de la secuencia	SEQ ID
AA - Aminoácido; NA - Ácido Nucleico; Δ -que tiene una deleción	NO:
NA etiqueta His	86
dímero del dominio Z Δ 1 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (A29K)	87
dímero del dominio Z Δ 2 AA-el primer dominio no tiene la deleción no Fab (A29K)	88
dímero del dominio A Δ 4 AA-el primer dominio tiene una deleción N-terminal	89
dímero del dominio D Δ 4 AA-el primer dominio tiene una deleción N-terminal	90
pentámero del dominio Z no Fab (A29K)	91
AA del dímero del dominio C	92
pentámero del dominio C Δ 4 AA con el primer dominio teniendo alanina en el extremo N no Fab (G29K)	93
pentámero del dominio C Δ 4 AA con el primer dominio con alanina en el extremo N	94
pentámero del dominio C no Fab (G29K) AA	95
pentámero del dominio C de tipo salvaje AA	96

II. Generación de Moléculas basadas en SpA para Uso como Ligandos de Cromatografía

Los ligandos de cromatografía de afinidad basados en SpA englobados por la presente invención pueden prepararse usando cualesquiera métodos adecuados conocidos en la técnica.

- 5 Por ejemplo, como una etapa inicial, pueden usarse técnicas de ingeniería genética estándar, p. ej., aquellas descritas en el manual de laboratorio titulado Molecular Cloning por Sambrook, Fritsch y Maniatis, para la generación de ácidos nucleicos que expresan las moléculas de ligando de SpA descritas en la presente memoria.

- 10 En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más dominios de SpA que tienen una deleción en el extremo N puede clonarse en un vector adecuado para la expresión en una célula huésped apropiada. Los vectores de expresión adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen típicamente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia que codifica la SpA variante.

- 15 Las moléculas de SpA descritas en la presente memoria también pueden sintetizarse químicamente a partir de precursores de aminoácidos para fragmentos usando métodos muy conocidos en la técnica, incluyendo métodos sintéticos de péptidos en fase sólida tales como las estrategias que usan Boc (terc-butiloxicarbonilo) o Fmoc (9-fluorenilmetiloxi carbonilo) (véanse, p. ej., las Pat. U.S. Nos. 6.060.596; 4.879,378; 5.198.531; 5.240.680).

La expresión de las moléculas de SpA descritas en la presente memoria puede conseguirse en una variedad de tipos de células tales como, p. ej., células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insecto y células de mamífero y células huésped procariotas, p. ej., bacterias tales como *E. coli*.

- 20 En algunas realizaciones, las moléculas de SpA pueden expresarse en la superficie de un bacteriófago de manera que cada fago contiene una secuencia de ADN que codifica una molécula de SpA individual presentada en la superficie del fago. La afinidad de la molécula de SpA para una inmunoglobulina puede evaluarse fácilmente mediante el uso de técnicas estándar en la técnica y aquellas descritas en la presente memoria, p. ej., configuración estándar de ELISA y Biacore™ 2000 (BIACORE AB, Uppsala Suecia). Es deseable que la afinidad de unión de una molécula de SpA de la presente invención para una inmunoglobulina sea al menos comparable con la de la molécula parental, en el que la molécula presenta una fragmentación reducida durante su uso, como se describe en la presente memoria.
- 25

III. Soportes Usados para la Preparación de Matrices de Cromatografía

En algunas realizaciones, los ligandos de SpA englobados por la presente invención se inmovilizan en un soporte, p. ej., un soporte sólido o un soporte soluble, para generar una matriz de cromatografía de afinidad adecuada para la separación de biomoléculas tales como, p. ej., inmunoglobulinas y proteínas que contienen Fc.

- 5 En algunas realizaciones, un ligando según la presente invención se inmoviliza en un soporte sólido. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se contempla que cualquier soporte sólido puede usarse para la unión de un ligando según la invención. Por ejemplo, las matrices de soporte sólido incluyen, pero no están limitadas a, vidrio con poro controlado, sílice, óxido de circonio, óxido de titanio, agarosa, polimetacrilato, poliácido, poliácridamida, poliviniléter, polivinil alcohol y poliestireno y derivados de estos (p. ej., aleaciones de estos). Un soporte sólido puede ser un material poroso o un material no poroso.

- 10 En algunas realizaciones, un soporte sólido es un material poroso. Un material poroso usado como un soporte sólido puede estar comprendido por un compuesto hidrofílico, un compuesto hidrofóbico, un compuesto oleofóbico, un compuesto oleofílico o cualquier combinación de estos. El material poroso puede estar comprendido por un polímero o un copolímero. Los ejemplos de materiales porosos adecuados incluyen, pero no están limitados a, poliéter sulfona, poliamida, p. ej., nilón, polisacáridos tales como, por ejemplo, agarosa y celulosa, poliácido, polimetacrilato, poliácridamida, polimetacrilamida, politetrafluoroetileno, polisulfona, poliéster, fluoruro de polivinilideno, polipropileno, polietileno, polivinil alcohol, poliviniléter, policarbonato, polímero de un fluorocarbono, p. ej., poli (tetrafluoroetileno-co-perfluoro(alquil vinil éter)), vidrio, sílice, circonia, titania, cerámica, metal y aleaciones de estos.

- 15 El material poroso puede estar comprendido por una molécula orgánica o inorgánica o una combinación de moléculas orgánicas e inorgánicas y puede estar comprendido por uno o más grupos funcionales, p. ej., un grupo hidroxilo, un grupo epoxi, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo carbonilo o un grupo ácido carboxílico, adecuado para reaccionar, p. ej., formando enlaces covalentes para una modificación química adicional, con el fin de unirse covalentemente a una proteína. En otra realización, el material poroso puede no poseer un grupo funcional, pero puede estar recubierto con una capa de material que porta grupos funcionales tales como, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo aminoácido, un grupo carbonilo o un grupo ácido carboxílico.

- 20 En algunas realizaciones, se usa una matriz de separación de afinidad convencional, p. ej., de naturaleza orgánica y basada en polímero que exponen una superficie hidrofílica al medio acuoso usado, es decir, exponen grupos hidroxilo (–OH), carboxi (–COOH), carbonilo (–CHO, o RCO-R'), carboxamido (–CONH₂, posiblemente en formas N-sustituidas), amino (–NH₂, posiblemente en forma sustituida), oligo o polietileno en sus superficies externa y, si está presente, también interna. En una realización, los polímeros pueden estar basados, por ejemplo, en polisacáridos, tales como dextrano, almidón, celulosa, pululano, agarosa *etc.*, que ventajosamente se han entrecruzado, por ejemplo, con bisepóxidos, epihalohidrinatos, bromuro de alilo, aliglicidil éter, hidrocarburos inferiores sustituidos 1,2,3-trihalo, para proporcionar una porosidad y una rigidez adecuadas. En otra realización, el soporte sólido comprende lechos de agarosa porosos. Los diferentes soportes usados en la presente invención pueden prepararse fácilmente según métodos estándar conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, gelificación en suspensión inversa descrita, p. ej., en Hjerten, *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393-398 (1964). Alternativamente, las matrices base pueden ser productos disponibles comercialmente, tales como Sepharose™ FastFlow (GE HEALTHCARE, Uppsala, Suecia). En algunas realizaciones, especialmente ventajosas para separaciones a gran escala, el soporte se adapta para incrementar su rigidez y, por lo tanto, hace que la matriz sea más adecuada para velocidades de flujo altas.

- 25 Alternativamente, el soporte sólido puede estar basado en polímeros sintéticos, tales como polivinil alcohol, poliviniléter, polihidroxialquil acrilatos, polihidroxialquil metacrilatos, poliácridamidas, polimetacrilamidas *etc.* En el caso de polímeros hidrofóbicos, tales como matrices basadas en bencenos sustituidos con divinilo y monovinilo, la superficie de la matriz se hidrofilita frecuentemente para exponer grupos hidrofílicos como se ha definido anteriormente a un líquido acuoso circundante. Dichos polímeros pueden producirse fácilmente según métodos estándar, véase p. ej., Arshady, *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988). Alternativamente, puede usarse un producto disponible comercialmente, tal como Source™ (GE HEALTHCARE, Uppsala, Suecia) y Poros (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA).

- 30 En otras realizaciones más, el soporte sólido comprende un soporte de naturaleza inorgánica, p. ej., sílice, óxido de circonio, óxido de titanio y aleaciones de estos. La superficie de las matrices inorgánicas se modifica frecuentemente para incluir grupos reactivos adecuados para una reacción adicional con SpA y sus variantes. Los ejemplos incluyen CM Zirconia (CIPHERGEN-BioSeptra (CERGOPONTOISE, Francia) y CPG® (MILLIPORE).

- 35 En algunas realizaciones, el soporte sólido puede estar basado, por ejemplo, en circonia, titania o sílice en la forma de vidrio con poro controlado, que puede modificarse bien para contener grupos reactivos y/o para aguantar el empape cáustico, para acoplarse a ligandos.

Los formatos de soporte sólido ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un lecho (esférico o irregular), una fibra hueca, una fibra sólida, una almohadilla, un gel, una membrana, un casete, una columna, un chip, un portaobjetos, una placa o un monolito.

5 Respecto al formato de una matriz, en una realización, está en la forma de un monolito poroso, que puede prepararse usando un material inorgánico tal como, p. ej., sílice, o un material orgánico tal como, p. ej., polimetacrilato, poliácridato, poliácridamida, polimetacrilamida, politetrafluoroetileno, polisulfona, poliéster, fluoruro de polivinilideno, polipropileno, polietileno, polivinil alcohol, poliviniléter y policarbonato. En el caso de un monolito, puede formarse mediante polimerización o por recubrimiento de un sustrato.

10 En una realización alternativa, la matriz está en forma de lecho o de partícula que puede ser porosa o no porosa. Las partículas pueden ser esféricas o no esféricas, así como magnéticas o no magnéticas. Las matrices en forma de lecho o de partícula pueden usarse como un lecho empaquetado o en una forma suspendida. Las formas suspendidas incluyen aquellas conocidas como lechos expandidos y suspensiones puras, en las que las partículas o lechos tienen un movimiento libre. En el caso de los monolitos, lechos empaquetados y lechos expandidos, el procedimiento de separación sigue comúnmente la cromatografía convencional con un gradiente de concentración.

15 En el caso de una suspensión pura, se usará el modo discontinuo. También, puede usarse el soporte sólido en formas tales como una superficie, un chip, un capilar o un filtro.

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

20 En otra realización, un ligando según la presente invención se une a un soporte sólido, p. ej., un polímero soluble o un polímero soluble en agua. Los soportes solubles ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un biopolímero tal como, p. ej., una proteína o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, puede usarse biotina como un polímero soluble, p. ej., como se describe en la Publicación de Patente US No. 20080108053. Por ejemplo, la biotina puede unirse a un ligando, p. ej., un ligando basado en SpA según la presente invención, que posteriormente a unirse al ligando, puede usarse para aislar una proteína de interés, p. ej., un anticuerpo o fragmento de este, p. ej., presente

25 en una mezcla cruda y la proteína de interés puede aislarse o separarse mediante precipitación del complejo de polímero biotina-ligando-proteína bien de forma reversible o irreversible. El polímero también puede ser un polímero soluble sintético, tal como, por ejemplo, incluyendo, pero no limitado a, un polímero que contiene grupos cargados negativamente (carboxílicos o sulfónicos), grupos cargados positivamente (amina cuaternaria, amina terciaria, grupos secundarios o primarios), grupos hidrofóbicos (grupos fenilo o butilo), grupos hidrofílicos (grupos hidroxilo o amino) o una combinación de los anteriores. Los polímeros solubles sintéticos ejemplares pueden encontrarse en la

30 Publicación PCT Internacional No. WO2008091740 y en la Publicación U.S. No. US20080255027. Estos polímeros, después de cambios físicos específicos en una o más condiciones tales como pH, conductividad o temperatura, pueden usarse para purificar la proteína de interés mediante precipitación bien de una forma reversible o irreversible. Los polímeros solubles sintéticos pueden usarse solos o pueden acoplarse con un ligando según la presente

35 invención y usarse para la captura/purificación de una proteína de interés tal como, p. ej., un anticuerpo o fragmento de este, mediante precipitación bien de una forma reversible o irreversible.

En algunas realizaciones, los ligandos se unen a una membrana en un formato de placa con múltiples pocillos. En otras realizaciones más, los ligandos se incorporan en un dispositivo capilar o microfluídico.

IV. Métodos para Unir un Ligando a un Soporte

40 Puede usarse cualquier técnica adecuada para unir un ligando descrito en la presente memoria a un soporte, p. ej., un soporte sólido incluyendo aquellas muy conocidas en la técnica y descritas en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando puede estar unido a un soporte mediante técnicas de acoplamiento convencionales utilizando, p. ej., los grupos amino y/o carboxi presentes en el ligando. Por ejemplo, los bisepóxidos, epiclorohidrina, CNBr, N-hidroxisuccinimida (NHS) *etc.*, son reactivos de acoplamiento muy conocidos. En algunas

45 realizaciones, se introduce un espaciador entre el soporte y el ligando, que mejora la disponibilidad del ligando y facilita el acoplamiento químico del ligando al soporte.

En varias realizaciones englobadas por la presente invención, se une más de un sitio en un ligando a un soporte sólido (es decir, unión de múltiples puntos), lo que da como resultado de esta manera una matriz de cromatografía de afinidad que muestra una fragmentación reducida del ligando después de la exposición cáustica prolongada

50 (tanto en el caso del ligando libre como en el del ligando unido).

La unión de un ligando de cromatografía basado en SpA a un soporte sólido puede conseguirse mediante muchas maneras diferentes conocidas, la mayor parte de las cuales son muy conocidas en la técnica, así como las descritas en la presente memoria. Véase, p. ej., Hermanson et al., *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, p. 51-136 (1992).

55 Por ejemplo, los ligandos proteicos pueden acoplarse a un soporte sólido mediante grupos activos bien en la superficie del soporte sólido o el ligando proteico, tales como, por ejemplo, grupos hidroxilo, tiol, epóxido, amino, carbonilo, epóxido o ácido carboxílico. La unión puede conseguirse usando químicas conocidas incluyendo, pero no

limitado a, el uso de bromuro de cianógeno (CNBr), N-hidroxil succinimida éster, activación epoxi (bisoxirano) y aminación reductora.

Por ejemplo, el acoplamiento de proteínas dirigido por tiol se ha descrito en la bibliografía. Véase, p. ej., Ljungquist, et al. Eur. J. Biochem. Vol 186, p. 558-561 (1989). Esta técnica se ha aplicado previamente para el acoplamiento de SpA a un soporte sólido. Como SpA de tipo salvaje no contiene grupos tiol, la unión se consigue mediante la inserción de forma recombinante de una cisteína que contiene tiol en el extremo C de SpA. Véase, p. ej., la Patente U.S. No. 6.399.750. Varios productos comerciales tales como MabSelect™, MabSelect™ Xtra y MabSelect™ SuRe, MabSelect™ SuRe LX se producen mediante este mecanismo. Se ha reportado que esta cisteína terminal solo reacciona con el grupo epóxido en la superficie sólida, dando como resultado de esta manera a un único punto de unión de la SpA al soporte sólido. Véase, p. ej., Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry, CRC Press, 2006, página 473.

En algunas realizaciones según la presente invención, más de un sitio en los ligandos de cromatografía basados en SpA se une a un soporte sólido mediante una unión de múltiples puntos no discriminada. En general, SpA contiene grupos amino libres abundantes de numerosas lisinas en cada dominio. La unión de un dominio de SpA a un soporte sólido mediante una unión de múltiples puntos, p. ej., una resina de cromatografía con grupo epóxido o aldehído, puede conseguirse haciendo reaccionar el grupo amino de lisina en SpA, mediante la apertura del anillo epóxido o aminación reductora, respectivamente. En determinadas realizaciones, la unión de múltiples puntos puede conseguirse por la reacción de uno o más aminoácidos naturales en SpA que tienen grupos hidroxilo libres, tales como, por ejemplo, serina y tirosina, con un soporte que contiene un grupo epóxido mediante una reacción de apertura del anillo. Alternativamente, la unión de múltiples puntos puede conseguirse, por ejemplo, por la reacción de aminoácidos naturales en SpA que tienen grupos ácido carboxílico libres, tales como, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico, con un soporte que contiene grupos amino mediante, por ejemplo, *N,N'*-carbonyldiimidazol. La unión de múltiples puntos del ligando al soporte también puede conseguirse por una combinación de todos los mecanismos anteriores.

Los ligandos de cromatografía basados en SpA también pueden unirse a un soporte sólido mediante un mecanismo asociativo. Por ejemplo, un grupo asociativo puede interactuar con un ligando de interés no covalentemente mediante interacción iónica, hidrofóbica o una combinación de interacciones, para unir de esta manera el ligando de interés a la superficie sólida. Esto facilita el acoplamiento de alta eficiencia del ligando a la matriz sólida, por ejemplo, como se describe en las Patentes U.S Nos. 7.833.723 y 7.846.682 dando como resultado de esta manera a una densidad del ligando mayor que sin los grupos asociativos. Los grupos asociativos adecuados para uso en la invención incluyen especies cargadas tales como especies iónicas y especies no cargadas tales como especies hidrofóbicas. El grupo asociativo puede modificar el soporte sólido, p. ej., uniéndose covalentemente directamente con el soporte sólido. Los ejemplos adecuados de especies iónicas pueden incluir aminas cuaternarias, aminas terciarias, aminas secundarias, aminas primarias, un grupo sulfónico, ácido carboxílico, o cualquier combinación de estos. Los ejemplos adecuados de especies hidrofóbicas pueden incluir un grupo fenilo, un grupo butilo, un grupo propilo o cualquier combinación de estos. También se contempla que pueden usarse especies de modo mixto. El grupo asociativo también puede interactuar con el ligando proteico. Así, la interacción entre el grupo asociativo y el ligando proteico puede estar comprendida por una mezcla de interacciones, p. ej., de especies iónicas e hidrofóbicas.

El grupo asociativo puede acoplarse covalentemente al soporte sólido haciendo reaccionar un grupo funcional en el soporte sólido con un grupo funcional en el grupo asociativo. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero no están limitados a aminas, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, imina, aldehído, cetona, alqueno, alquino, azo, nitrilo, epóxido, cianógenos y grupos ácido carboxílico activados. Como un ejemplo, los lechos de agarosa contienen grupos hidroxilo que pueden hacerse reaccionar con la funcionalidad epóxido de un grupo asociativo cargado positivamente, tal como cloruro de glicidil trimetilamonio. Un experto en la técnica apreciará que puede acoplarse una pluralidad de grupos asociativos al soporte sólido siempre que se use al menos un grupo asociativo bifuncional. Así, los grupos asociativos pueden acoplarse en tándem al soporte sólido o pueden acoplarse individualmente directamente al soporte sólido.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona grupos asociativos y/o ligandos proteicos que pueden acoplarse a un soporte sólido mediante un conector interviniente. El conector puede comprender al menos un grupo funcional acoplado a un resto conector. El resto conector puede comprender cualquier molécula capaz de acoplarse a un grupo funcional. Por ejemplo, el resto conector puede incluir cualquiera de un grupo alquilo, un alqueno o un alquínilo. El resto conector puede comprender una cadena de carbono que varía de 1 a 30 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el conector puede estar comprendido por más de 30 átomos de carbono. El resto conector puede comprender al menos un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno y azufre. El resto conector puede estar comprendido por una cadena ramificada, una cadena no ramificada o una cadena cíclica. El resto conector puede estar sustituido con dos o más grupos funcionales.

La elección de las condiciones de tamponamiento apropiadas para el acoplamiento de un ligando proteico a un soporte sólido está dentro de la capacidad del experto en la técnica. Los tampones adecuados incluyen, p. ej., acetato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, etc, o cualquier combinación

de los anteriores, con la concentración variando de 10mM a 5M. En algunas realizaciones, la concentración de sal varía de 0,1M a 1,5M.

Los tampones adecuados adicionales incluyen cualquier tampón que no contiene amina tal como tampones carbonato, bicarbonato, sulfato, fosfato y acetato o una combinación de los anteriores. Cuando se usa química asociativa, la concentración de sal del tampón dependerá del grupo asociativo usado. Por ejemplo, la concentración de sal puede estar en el intervalo de 5nM-100mM. Cuando se usa una especie cargada, la concentración de sal puede ser al menos 5nM pero menos de 0,1M, al menos 5nM pero menos de 0,01M, al menos 5nM pero menos de 0,001M. En determinadas realizaciones, la concentración de sal puede ser 0,01M. Cuando se usa una especie hidrofóbica, es deseable habitualmente una alta concentración de sal. Así, la concentración de sal puede ser mayor de 0,001M, mayor de 0,01M o mayor de 0,1M.

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

V. Ensayo para Determinar la Fragmentación Reducida de los Ligandos

La presente invención proporciona matrices de cromatografía de afinidad que incorporan ligandos SpA basados en uno o más dominios C, en el que uno o más dominios incluyen una delección de 3 o 4 o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2. En algunas realizaciones, se une más de un sitio en un ligando basado en SpA a una matriz de cromatografía.

La presente invención se basa en un descubrimiento inesperado y sorprendente de que los ligandos descritos en la presente memoria, tanto en la forma libre como cuando se inmovilizan en un soporte sólido (p. ej., una matriz de cromatografía), presentan una fragmentación reducida después de la exposición a condiciones cáusticas prolongadas durante su uso en procesos de purificación. Como se ha discutido anteriormente, dicha fragmentación es indeseable ya que da lugar a fragmentos potencialmente inmunogénicos de los dominios de SpA terminando con la proteína diana potencialmente terapéutica. Además, la fragmentación hace que el proceso de purificación sea más costoso debido a la necesidad de usar más ligando durante el proceso.

La fragmentación de ligandos de afinidad puede detectarse fácilmente usando métodos conocidos en la técnica y aquellos descritos en la presente memoria. Dichos métodos incluyen, pero no están limitados a, SDS-PAGE y SEC.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecil sulfato de sodio (SDS) se usa comúnmente para el análisis del peso molecular de proteínas. El SDS es un detergente que disocia y despliega las proteínas. El SDS se une a los polipéptidos para formar complejos con relaciones bastante constantes de carga a masa. La velocidad de migración electroforética a través de un gel solo está determinada, por lo tanto, por el tamaño de los complejos. Los pesos moleculares se determinan corriendo simultáneamente proteínas marcadoras con un peso molecular conocido. El gel se tiñe típicamente y puede visualizarse la presencia de biomoléculas con diferentes pesos moleculares.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método en el que las moléculas en disolución se separan por su tamaño. Habitualmente, se aplica a complejos grandes o macromoleculares tales como proteínas y polímeros industriales. La detección de diferentes especies moleculares se realiza típicamente por UV-Vis o por dispersión de la luz. En el caso de UV-Vis, se elige una longitud de onda específica para la detección de determinadas especies. Los órdenes en los que eluyen determinadas especies moleculares, según se observa en el cromatograma, así como la intensidad de los picos correspondientes, proporciona información sobre el tipo de especie, así como sobre la cantidad relativa.

Como se demuestra por los ejemplos incluidos en la presente memoria, los ligandos SpA según la presente invención presentan una fragmentación reducida respecto a sus equivalentes wt, después de la exposición a condiciones cáusticas. En un experimento ejemplar para mostrar la fragmentación reducida, un ligando SpA que tiene una delección en el extremo N, como se describe en la presente memoria, y su equivalente wt, se exponen ambos a NaOH 0,5M durante 25 hrs. La disolución se neutraliza entonces con un ácido hasta pH 7. Las disoluciones neutralizadas se inyectan en SEC o se cargan en un gel de SDS-PAGE para análisis y comparación.

En otro experimento ejemplar para mostrar la fragmentación reducida, una matriz de cromatografía de afinidad que incluye un ligando que tiene una delección en el extremo N unido a un soporte sólido (inmovilizado por unión de múltiples puntos), como se describe en la presente memoria, así como una matriz de cromatografía de afinidad que incluye su equivalente wt unido a un soporte sólido (inmovilizado por unión de múltiples puntos), se exponen ambas a NaOH 0,5M durante 25 hrs. La disolución cáustica y la matriz (p. ej., en la forma de una resina) se separan y se neutralizan inmediatamente con un ácido hasta pH 7. Las disoluciones neutralizadas se inyectan en SEC o se cargan en un gel de SDS-PAGE para análisis y comparación.

VI. Ensayo para Determinar la Estabilidad en Condiciones Alcalinas de los Ligandos

Además de presentar una fragmentación reducida durante su uso en procesos de purificación, los ligandos descritos en la presente memoria también son estables en condiciones alcalinas. Posteriormente a la generación de las matrices de cromatografía que incorporan los ligandos basados en SpA descritos en la presente memoria, puede ensayarse la estabilidad en condiciones alcalinas de las matrices que contienen los ligandos usando técnicas estándar en la técnica y aquellas descritas en la presente memoria.

Por ejemplo, la estabilidad en condiciones alcalinas de un ligando inmovilizado en una matriz puede ensayarse usando tratamiento rutinario con NaOH a una concentración de aproximadamente 0,5M, p. ej., como se describe en la presente memoria, así como en la Publicación de Patente U.S. No. 20100221844.

En algunas realizaciones, las moléculas de SpA estables en condiciones alcalinas, así como las matrices que incorporan las mismas, presentan una estabilidad en condiciones alcalinas "incrementada" o "mejorada", lo que significa que las moléculas y matrices que incorporan las mismas son estables en condiciones alcalinas durante un periodo de tiempo prolongado respecto a sus equivalentes wt. Previamente, se ha reportado que las matrices de cromatografía que incorporan ligandos SpA basados en el dominio B, C o Z wt de SpA o que tienen una mutación en uno o más residuos de asparagina proporcionan una estabilidad en condiciones alcalinas mejorada en condiciones en las que el pH es mayor de aproximadamente 10, tal como hasta aproximadamente 13 o 14. Sin embargo, parece que algunos de estos ligandos muestran fragmentación durante su uso, especialmente después de ciclos repetidos de CIP, como se observa por la presencia de fragmentos en un gel de SDS-PAGE o por SEC.

En algunas realizaciones, los ligandos según la presente invención, así como las matrices que incorporan los mismos, no son más estables en condiciones alcalinas que sus equivalentes wt; no obstante, presentan fragmentación reducida. Uno de dichos ligandos descrito en la presente memoria es una forma pentamérica del ligando del dominio C que incluye una delección en el extremo N en cada uno de los dominios y que incluye una mutación G29K en cada uno de los dominios. Dicho ligando puede incluir además una alanina con el primer aminoácido en el pentámero para facilitar el procesamiento homogéneo posterior a la traducción.

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente e inesperado de nuevos ligandos SpA (tanto en forma libre, así como cuando se inmovilizan en una matriz de cromatografía) que presentan una fragmentación reducida durante su uso en procesos de purificación respecto a algunos de los ligandos descritos previamente, además de retener al menos un 95% de la capacidad de unión inicial después de la exposición prolongada a condiciones cáusticas (p. ej., NaOH 0,1M durante 25 horas o más). En algunas realizaciones, más de un sitio en los ligandos se une a un soporte sólido y estos ligandos se basan en dominios C de SpA, en el que los ligandos tienen una delección de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2.

En algunas realizaciones, después de 100 ciclos, incluyendo cada ciclo un tratamiento de 15 min con NaOH 0,5M, el porcentaje de capacidad de unión retenida de los ligandos SpA descritos en la presente memoria (p. ej., aquellos que comprenden uno o más dominios C, en el que al menos uno de los dominios C incluye una delección de al menos 3 aminoácidos consecutivos del extremo N), es al menos 1,25 veces mayor, 1,5 veces mayor, 2,0 veces mayor, 2,5 veces mayor o 3 veces mayor que el equivalente wt.

En una realización, la estabilidad en condiciones alcalinas del ligando inmovilizado, según se ensaya por la retención de la capacidad de unión a IgG con el tiempo, se mide como sigue. La capacidad de unión, referida como Qd 50%, se mide mediante la obtención del volumen de IgG cargada a una concentración basada en la absorbancia a UV_{280nm} del 50% de la concentración de IgG inicial. La Qd 50% inicial de la matriz de cromatografía (p. ej., resina empaquetada en una columna) se mide en primer lugar. La matriz de cromatografía (p. ej., una resina como se ha descrito anteriormente) se expone entonces a aproximadamente 10 ciclos de una exposición de 15 de NaOH 0,5M a 0,8 mL/min. La Qd 50% se mide de nuevo. Este proceso se repite hasta que la matriz de cromatografía se expone a un total de aproximadamente 100 ciclos de NaOH 0,5M. La Qd 50% se mide una última vez y los resultados de la matriz de cromatografía de afinidad que incluye ligandos (p. ej., resina de cromatografía inmovilizada con ligandos) como se describe en la presente memoria se comparan con el tipo respectivo de dominios wt de SpA.

En otro ensayo, la estabilidad en condiciones cáusticas o alcalinas de la matriz se mide por empape estático de la matriz. Mediante el empape de una cantidad medida de una matriz de cromatografía de afinidad (p. ej., en formato de resina) en NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M durante 25 hrs con rotación suave y medición de la capacidad de unión a IgG antes y después del empape con NaOH, se puede determinar la estabilidad en condiciones alcalinas mediante la retención de la capacidad de unión de la matriz para IgG.

VII. Métodos para Purificar una Molécula Diana Usando una Matriz de Cromatografía de la Invención

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para purificar una molécula diana a partir de una mezcla usando las matrices de cromatografía de afinidad descritas en la presente memoria. La molécula diana puede ser cualquier molécula que es reconocida por un ligando de afinidad proporcionado en la presente memoria, en el que el ligando se acopla a un soporte sólido (es decir, una matriz de cromatografía). Los ejemplos de moléculas diana incluyen inmunoglobulinas y proteínas que contienen Fc. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional de estos. Los fragmentos funcionales

incluyen cualquier fragmento de una inmunoglobulina que comprende una región variable que todavía se une específicamente a su antígeno mientras al mismo tiempo retiene su capacidad de unirse específicamente a un ligando proteico acoplado a un soporte sólido.

5 Se describe un método para aislar una molécula diana de interés usando una matriz de cromatografía de afinidad descrita en la presente memoria que incluye las etapas de: (a) poner en contacto un soporte sólido que incluye un ligando de cromatografía basado en SpA inmovilizado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13-42, SEQ ID NO: 55-84 y SEQ ID NO: 93-95, con una mezcla que comprende una molécula diana en condiciones tales que la molécula diana se une específicamente al ligando; y (b) alterar las condiciones de manera que la molécula diana ya no esté unida al ligando, aislando de esta manera la molécula diana.

10 En algunas realizaciones, la etapa de alteración incluye alterar el pH, de manera que la molécula diana ya no esté unida al ligando. En una realización particular, el pH se altera de una manera tal que es más ácido que las condiciones de pH de la etapa (a). Por ejemplo, en una realización, la etapa (a) puede realizarse a un pH neutro, o a un pH que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 y la etapa (b) puede realizarse a un pH ácido, p. ej., un pH que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.

15 En otra realización, la etapa (b) comprende alterar la concentración de sal del tampón que se usa, de manera que la molécula diana ya no esté unida al ligando. Por ejemplo, en una realización, puede usarse una alta concentración de sal, p. ej., > 0,1M, en la etapa (a) y puede usarse una menor concentración de sal, p. ej., <0,1M en la etapa (b). A la inversa, en algunas realizaciones, puede usarse una baja concentración de sal, p. ej., < 0,1M en la etapa (a) y puede usarse una alta concentración de sal en la etapa (b). En otras realizaciones más, tanto el pH como la concentración de sal del tampón pueden alterarse entre la etapa (a) y la etapa (b).

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones adecuadas para la unión de una molécula diana a un ligando y, de esta manera, alterar las condiciones para disrumpir la unión de la molécula al ligando.

25 En general, se contempla que los ligandos descritos en la presente memoria pueden usarse en cualquier proceso de purificación o en un tren de proceso de purificación en el que se usan típicamente SpA nativa y SpA recombinante. En otras palabras, es deseable generalmente reemplazar la SpA nativa (p. ej., aislada de *S. aureus*) y la SpA recombinante (p. ej., SpA wt expresada recombinantemente) en los procesos presentes en la técnica con los ligandos descritos en la presente memoria, con el fin de reducir el coste global, así como para mitigar el riesgo de fragmentos de SpA potencialmente inmunogénicos que se copurifican con una molécula terapéutica potencial.

30 Se describe un método para la purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad, en el que el método incluye las etapas siguientes: poner en contacto una alimentación del proceso con una matriz de cromatografía de afinidad según la invención con el fin de unir uno o más anticuerpos de la alimentación; una etapa de lavado opcional; añadir un tampón de elución adecuado para liberar los anticuerpos unidos de la matriz; y recuperar el uno o más anticuerpos del eluato. Las matrices de cromatografía de afinidad descritas en la presente memoria también pueden usarse para aislar anticuerpos de líquidos de cultivos, sobrenadantes, así como caldos de fermentación. En el caso de los caldos de fermentación, el uso de matrices de cromatografía de afinidad permite la separación de anticuerpos de proteínas de la célula huésped (HCP), ADN, virus, endotoxinas, nutrientes, uno o más componentes de un medio de cultivo celular, p. ej., agentes antiespumantes y antibióticos, e impurezas relacionadas con el producto, tales como especies plegadas erróneamente y agregados.

40 En una realización específica, la alimentación se somete a filtración mecánica antes de ponerla en contacto con la matriz de cromatografía de afinidad descrita en la presente memoria y, consecuentemente, la fase móvil es un caldo de cultivo celular aclarado. Las condiciones adecuadas para la adsorción son muy conocidas para los expertos en la técnica.

45 Se describe un proceso con múltiples etapas para la purificación de anticuerpos, proceso que comprende una etapa de captura usando una matriz de cromatografía de afinidad descrita en la presente memoria seguida de una o más etapas posteriores para la purificación de intermedios y/o pulido de los anticuerpos. En una realización particular, la etapa de captura está seguida de cromatografía de interacción hidrofóbica y/o de intercambio iónico y/o cromatografía de partición débil en modo unir y eluir o flujo de salida. En una etapa alternativa, la etapa de captura está seguida de cromatografía de aniónico o catiónico multimodal y/o cromatografía de partición débil en modo unir y eluir o flujo de salida.

50 En otra realización, cualquier ligando basado en SpA lixiviado de la matriz de cromatografía de afinidad puede retirarse por las etapas de purificación posteriores hasta niveles aceptables, p. ej., hasta niveles que se consideran aceptables para un ligando de Proteína A nativa.

55 En general, se contempla que los ligandos descritos en la presente memoria pueden usarse en cualquier proceso que emplea típicamente ligandos de Proteína A.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de Ligandos de SpA Con Uno o Más Dominios que Tienen una Delección en el Extremo N de 4 aminoácidos consecutivos

5 Los genes sintéticos que codifican las siguientes proteínas se obtuvieron a partir de DNA 2.0 (Menlo Park, CA). Una proteína dimérica SpA que contenía dos dominios Z, conteniendo cada dominio la mutación en la posición 29 (A29K) para reducir o eliminar la unión a Fab (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 85); y una proteína dimérica SpA que contenía dos dominios Z, conteniendo cada dominio la mutación A29K y conteniendo el segundo dominio Z una delección para deleccionar 4 aminoácidos consecutivos del extremo N (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:78).

10 El extremo 5' de cada gen sintético incluye un codón para una metionina de inicio y el extremo 3' incluye seis codones de histidina (SEQ ID NO:86) para la purificación posterior usando una columna NiNTA. Los extremos 5' y 3' de cada gen contienen los sitios de restricción NdeI y BamHI, respectivamente. Estos genes sintéticos, así como el vector de expresión que se usa, es decir, pET11a (EMD), se digieren con NdeI y BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA), los fragmentos de ADN se separan en un gel agarosa TAE al 0,7% y los fragmentos de ADN apropiados se escinden y purifican usando el kit de extracción de gel de QIAGEN (Valencia, CA). Los insertos purificados se ligan en el núcleo de un pET11a o cualquier otro vector de expresión adecuado usando ADN ligasa T4 (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA).

20 La reacción de ligación se transforma en *E. coli* DH5 α competentes (INVITROGEN, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante, y se siembran en placas Technova LB que contienen 100 μ g/mL de ampicilina y se crecen toda la noche a 37°C. Con el fin de obtener ADN purificado, se toman colonias individuales para un cultivo de toda la noche en LB que contiene 100 μ g/mL de ampicilina. El ADN se purifica usando kits spin mini-prep de QIAGEN (Valencia, CA). La identidad de los plásmidos recombinantes se confirma por análisis de digestión de restricción usando NdeI y BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA). Los mapas plasmídicos para los plásmidos que incluyen ambos genes insertados para las construcciones diméricas del dominio Z se muestran en la Figura 2.

25 Adicionalmente, se generan construcciones que expresan una forma pentamérica del ligando SpA que contiene 5 dominios Z, conteniendo cada dominio la mutación A29K (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:91); así como una forma pentamérica del ligando SpA que contiene 5 dominios Z, con cada dominio conteniendo la mutación A29K así como conteniendo todos excepto los primeros dominios una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:84).

30 Además, también se generan construcciones del ligando SpA dimérico que contiene dominios C. Se genera una construcción dimérica que expresa un ligando de dominio C, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:92; así como se genera una construcción dimérica que expresa un ligando de 2 dominios C, en el que solo el segundo dominio C incluye una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:35. Estos ligandos de dominio C diméricos no tienen una mutación en la posición 29.

Ejemplo 2: Expresión y Purificación de Ligandos Basados en SpA

40 Como se ha discutido anteriormente, cualquier sistema de expresión bacteriano adecuado puede usarse para expresar los distintos ligandos SpA descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la proteína puede expresarse en una cepa de *Escherchia coli* tal como la cepa BL21(DE3) (PROMEGA, Madison WI) usando un vector pET tal como pET11a (EMD).

45 Se selecciona una única colonia de una placa y se crece toda la noche a 37°C en medio LB que contiene 100 μ g/mL de ampicilina. El cultivo de toda la noche se diluye 100 veces en medio LB fresco que contiene 100 μ g/mL de ampicilina y se crece 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 1mM, las células se crecen durante dos horas adicionales. La expresión se confirma por análisis de SDS-PAGE y transferencia Western.

50 Las células se recogen por centrifugación (4.000 rpm, 4°C, 5 minutos) y se resuspenden en 3 mL de disolución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20mM. Las células se lisan por sonicación y los restos celulares se sedimentan por centrifugación (4.000 rpm, 4°C, 30 minutos). Los ligandos SpA se purifican usando la resina NiNTA (QIAGEN), aplicando 25-30 mL de lisado celular por 3 mL de columna. Las columnas se lavan con 30 mL de disolución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 20mM dos veces y la SpA se eluye en fracciones de 3 mL de disolución salina tamponada con fosfato que contiene imidazol 200mM. La SpA se dializa toda la noche en agua 18 mega-Ohm Milli-Q® (MILLIPORE, Billerica, MA) seguido de NaHCO₃ 10mM. La concentración de proteína se confirma usando el espectrómetro UV basado en el coeficiente de extinción teórico (Pace et. al., Protein Science 4:2411 (1995)).

55

Ejemplo 3: Unión de Ligandos basados en SpA a un Soporte Sólido

Posteriormente a la generación y expresión de varios ligandos, como se describe en los Ejemplos 1 y 2, se inmovilizaron mediante la unión de múltiples puntos a un soporte sólido.

5 En un experimento ejemplar, se entrecruza resina de agarosa (Sephacrose 4B) (GE HEALTHCARE) usando epiclorohidrina según un método descrito previamente (Porath y Fornstedt, J. Chromatographs, 51:479 (1979)). La resina de agarosa se hace reaccionar posteriormente con grupos asociativos cargados positivamente, p. ej., cationes, según el siguiente método: a 10 mL de resina, se añaden 5 mL de 75% en peso de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTMAC), 5 mL de agua Milli-Q® (MILLIPORE, Billerica, MA) y 0,258 g de 50% en peso de hidróxido de sodio. El vial de la reacción se rota en un hidridizador Techne HB-1D (BIBBY SCIENTIFIC, Burlington, NJ) toda la noche a temperatura ambiente. La resina se filtra entonces y se lava con tres volúmenes de 10 mL de agua Milli-Q® (MILLIPORE, Billerica, MA).

15 La resina (10 mL, torta filtrada) se añade a un frasco que contiene 3 mL de NaOH 4,6M. La mezcla se pone en suspensión de sólidos y después se añaden 4 mL de butanodiol diglicidiléter (BUDGE). Esta mezcla se rota a 35°C durante aproximadamente 2 horas. La resina se lava entonces con 5x 10 mL de agua Milli-Q® (MILLIPORE, Billerica, MA) y se equilibra con 2x 10 mL de NaHCO₃ 10mM.

Inmediatamente después de la etapa de activación con BUDGE, a 5 mL de la torta de lecho filtrada se añaden 10 mL de disolución de NaHCO₃ 10mM que contiene una concentración de 2,5 y 2,3 mg/mL de ligando de dominio Z dimérico que contiene una mutación A29K (SEQ ID:85) o el ligando de dominio Z dimérico que contiene delección en el extremo N en el segundo dominio Z (SEQ ID:78). La mezcla se tapa en un vial de vidrio y el vial se rota a 37°C durante aproximadamente 2 horas. Después de dos horas, la resina se lava 3 veces con 10 mL de agua Milli-Q®. La torta de lecho filtrada (10 mL) se añade a un frasco que contiene una disolución de 10 mL comprendida por 1 mL de tioglicerol y 9 mL de una disolución tampón con NaHCO₃ 0,2M y NaCl 0,5M. La mezcla se pone en suspensión de sólidos y se rota toda la noche a temperatura ambiente. La resina se lava entonces 3 veces con 10 mL de los siguientes tampones: tampón Tris 0,1M con NaCl 0,15M (pH 8) y ácido acético 50mM (pH 4,5). Esto se sigue por el lavado de la resina con 10 mL de agua Milli-Q® y 10 mL de disolución al 20% (v/v) de etanol agua. La resina final se almacena en una disolución al 20% (v/v) de alcohol agua antes de su uso adicional. El método de acoplamiento de los ligandos de dominio Z diméricos a un soporte sólido es similar al descrito en la presente memoria para los ligandos de dominio Z diméricos.

30 El método de acoplamiento de ligandos de 5 dominios descritos anteriormente (SEQ ID NO: 91 y 84) a resina con base de agarosa es similar al proceso anterior, excepto que se usan 15 mg/mL de ligando durante la etapa de acoplamiento. Los ligandos de dominio Z pentaméricos no contienen una etiqueta de 6 His.

Ejemplo 4: Análisis por SDS-PAGE de los Sobrenadantes Recogidos Después del Empape Cáustico de Ligandos Libres o Inmovilizados

35 El análisis por SDS-PAGE puede usarse para detectar la fragmentación de los ligandos libres e inmovilizados descritos en la presente memoria, después de una exposición cáustica prolongada. Un protocolo de SDS-PAGE se describe a continuación.

40 Se diluyen SpA en agua Milli-Q®, disolución de ligando empapada en cáustica neutralizada y disoluciones de resina empapada y neutralizadas (cada una contiene ~0,5 mg/mL de proteína) a una relación 1:1 con tampón de Laemmli (BIORAD, Hercules, CA). Las muestras se incuban a 70°C durante 5 minutos para asegurar que las proteínas estaban completamente desnaturalizadas. Se cargan 10 µL de cada muestra en un gel AnyKD (BIORAD, Hercules, CA) o gel Tris-HCl Ready al 15% (BIORAD, Hercules, CA). La electroforesis en gel se lleva a cabo en tampón de operación 1X Tris-Glicina-SDS (THERMOFISHER, Waltham, MA) a 200 voltios durante 30 minutos. El gel con SDS se tiñe entonces en reactivo de tinción Gelcode Azul (THERMOFISHER, Waltham, MA) durante 1 hora y se destiñe en agua Milli-Q® toda la noche.

Ejemplo 5: Análisis por SEC de los Sobrenadantes Recogidos Después del Empape Cáustico de los Ligandos Libres e Inmovilizados

Además del análisis por SDS-PAGE descrito anteriormente, también puede usarse SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) para el análisis de la fragmentación de los ligandos libres e inmovilizados después de un empape cáustico prolongado. Un experimento de SEC se describe a continuación.

50 La SEC se lleva a cabo en un sistema Agilent 1100 HPLC (AGILENT, Santa Clara, CA). Se centrifugan SpA control en agua Milli-Q®, disolución de ligando empapado cáustico neutralizado (-0,5 mg/mL), y disoluciones empapadas de resina neutralizadas a 13.500 RPM durante 10 minutos antes del análisis por SEC-HPLC. Las muestras se inyectan en 20 µL en la columna de SEC (SEPAX Zenix 7,8 mm X 300mm, SEPAX TECHNOLOGIES, INC. Newark, Delaware). Se usa tampón de fosfato de sodio (200mM, pH 7,0) como la fase móvil con una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se usa el software ChemStation de Agilent para la adquisición de los datos de SEC y el análisis tanto a 230 nm como a 280 nm.

Ejemplo 6: Empape Cáustico de los Ligandos

Después de la expresión de los ligandos, como se describe en el Ejemplo 2, los ligandos se exponen a condiciones alcalinas.

5 A 1 mL de cada uno de los ligandos descritos anteriormente (a una concentración de 1mg/mL), se añade 1 mL de NaOH 1M hasta una concentración final de NaOH 0,5M y 0,5 mg/mL de ligando. La muestra se rota suavemente durante 25 hrs. Esta disolución se neutraliza entonces hasta pH ~ 7 usando 32 µL de ácido acético glacial.

10 El análisis de fragmentación de los ligandos diméricos del dominio Z y dominio C usando SDS-PAGE después de con y sin empape cáustico se muestra en la Figura 3. Como se observa en la Figura 3, el ligando del dominio Z dimérico (A29K sin deleciones, mostrado en la SEQ ID NO:85, que se usa como el control) muestra una fragmentación significativa después de empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas, como se demuestra por la presencia de una mancha, así como la presencia de fragmentos más pequeños de alrededor de 7 KDa (véase el Carril 3). Por el contrario, el ligando de dominio Z dimérico que tiene la mutación A29K, así como una delección de 4 aminoácidos consecutivos en el segundo dominio (secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:78) parece estar en gran medida intacto después del empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas (véase el Carril 6).

15 De forma similar, el ligando del dominio C dimérico que no tiene deleciones (la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:92, usado como un control) muestra la presencia de una mancha, así como de fragmentos más pequeños de alrededor de 7 KDa en una SDS-PAGE después del empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas (véase el Carril 9) respecto a la construcción del dominio C dimérico que incluye una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N del segundo dominio, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:35 (véase el Carril 12).

Cada uno de los ligandos del dominio Z y C dimérico incluye adicionalmente una etiqueta de 6 His. Los ligandos que no se exponen a empape cáustico se muestran en el Carril 2 (control del dominio Z dimérico), Carril 5 (ligando de dominio Z dimérico que tiene una delección en el extremo N), Carril 8 (control del dominio C dimérico) y Carril 9 (ligando del dominio C dimérico que tiene una delección en el extremo N).

25 La fragmentación reducida de los ligandos del dominio Z y C dimérico que tienen una delección en el extremo N, después del empape cáustico prolongado, se pone de manifiesto además por SEC. Los resultados de un experimento de SEC representativo se muestran en la Figura 4 en la forma de un cromatograma de SEC. Como se observa en la Figura 4, los controles para el ligando del dominio Z (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:85) así como el ligando del dominio C (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:92) muestran una fragmentación significativa, identificada por flechas en el cromatograma en la Figura 4. Por el contrario, los ligandos del dominio Z y C dimérico que tienen las deleciones en el extremo N en el segundo dominio (la secuencia de aminoácidos del ligando del dominio Z se muestra en la SEQ ID NO:78 y la secuencia de aminoácidos del ligando del dominio C se muestra en la SEQ ID NO:35), muestran una fragmentación reducida, como se identifica por cajas en el cromatograma en la Figura 4.

35 Adicionalmente, las formas pentaméricas de los ligandos del dominio Z descritas anteriormente (es decir, el ligando del dominio Z pentamérico que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91 que representa el control y el ligando del dominio Z pentamérico que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84, que representa el ligando pentamérico que tiene una delección de 4 aminoácidos consecutivos en el extremo N en todos excepto en el primer dominio) también se analizaron para determinar su fragmentación por SDS-PAGE, después de empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas.

40 Como se pone de manifiesto por los datos del gel de SDS-PAGE en la Figura 5, la forma pentamérica del ligando del dominio Z que tiene una delección de 4 aminoácidos consecutivos del extremo N en todos excepto el primer dominio (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:84), muestra muchas menos fragmentación después del empape del ligando en NaOH 0,5M durante 25 horas (véase el Carril 3), respecto al control del ligando del dominio Z pentamérico, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:91 (véase el Carril 6). Como se ha discutido anteriormente, ambas formas de ligandos pentaméricos tienen la mutación A29K. Los ligandos que no se empapan parecen estar intactos (Carriles 2 y 5).

45 Los Carriles 8-10 representan la fragmentación observada con un ligando SpA recombinante (rSPA), que se usa rutinariamente en los procesos de purificación. El ligando rSPA parece mostrar un grado incluso mucho mayor de fragmentación después de empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas respecto al control del dominio Z, como se observa por una casi desaparición de la proteína en la SDS-PAGE (véase el Carril 9). El ligando rSPA no expuesto a condiciones cáusticas está en el Carril 8.

55 Este resultado parece sugerir que los ligandos basados en el dominio Z que tienen la delección en el extremo N, como se describe en la presente memoria, son candidatos muy superiores que los ligandos SpA usados rutinariamente tales como, p. ej., rSPA.

Una reducción en la fragmentación después de empape cáustico en NaOH 0,5M durante 25 horas observada con el ligando del dominio Z pentamérico que tiene la delección N-terminal se confirma además usando SEC, los resultados de uno de dichos experimentos representativos se muestran en la Figura 6.

5 Como se demuestra por el cromatograma en la Figura 6, el control de la forma pentamérica del dominio Z (SEQ ID NO:91) sin delección de aminoácidos muestra picos bien resueltos a un peso molecular menor, lo que indica la presencia de fragmentos más pequeños. Por el contrario, la forma pentamérica del dominio Z que tiene la delección en el extremo N (SEQ ID NO:84) muestra significativamente menos picos distintos a intensidad más baja, lo que indica un grado mucho menor de fragmentación, respecto al control.

10 El ligando SPA usado rutinariamente, rSPA, muestra la mayor fragmentación o degradación sin permanecer nada de molécula intacta. Notablemente, el cromatograma de SEC es consistente con los resultados del análisis por SDS-PAGE en la Figura 5, poniendo adicionalmente de manifiesto que el ligando rSPA se ha degradado de tal manera que no pueden observarse fragmentos significativos en un cromatograma de SEC después de la exposición prolongada a condiciones cáusticas (es decir, empape en NaOH 0,5M durante 25 horas).

Ejemplo 7: Empape Cáustico de Ligandos Inmovilizados en Resina

15 Los distintos ligandos descritos en los ejemplos anteriores se evalúan para determinar la fragmentación después de exposición cáustica posterior a su unión a un soporte sólido (p. ej., una resina de cromatografía de agarosa).

20 Para cada resina de interés, se miden 1 mL de resina en 5 mL de columna desechable de cromatografía (EVERGREEN SCIENTIFIC, Los Angeles, CA) usando agua Milli-Q®. La resina se acondiciona en una columna con 2 CV (2 mL) de NaOH 0,5M rápidamente, se vuelve a poner en suspensión de sólidos y se pone en vacío. Después de repetir la condición de NaOH una vez más, la torta húmeda puesta en vacío de la resina se transfiere a tubos de ensayo de 4 mL (THERMOFISHER, Waltham, MA). Se añaden 2 mL de NaOH 0,5M a la columna (la parte inferior está tapada) e inmediatamente se transfiere al tubo de ensayo con la resina correspondiente. Los tubos de ensayo tapados se ponen en un rotador y se rotan los tubos de ensayo durante 25 hrs. Al final del empape cáustico, el contenido de los tubos de ensayo se vierte en una columna desechable y se recoge el filtrado. El filtrado en 1,5 mL se neutraliza con 50 µL de ácido acético glacial y está listo para análisis adicional por SEC y SDS-PAGE.

El análisis por SDS-PAGE de los ligandos de los dominios Z y C diméricos inmovilizados después del empape cáustico prolongado (p. ej., empape con NaOH 0,5M durante 25 horas) se muestra en la Figura 3. En general, se espera que si un ligando es estable en condiciones cáusticas después de su inmovilización en una matriz de cromatografía (p. ej., una resina de agarosa), no mostrará ninguna fragmentación significativa.

30 Como se observa por el gel de SDS-PAGE de la Figura 3, ambos controles de los ligandos de los dominios Z y C diméricos inmovilizados (secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO:85 y 92, respectivamente y representados por los Carriles 4 y 10 del gel de SDS-PAGE, respectivamente) así como los ligandos de los dominios Z y C diméricos inmovilizados que contienen una delección en el extremo N en el segundo dominio (secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO:78 y 35, respectivamente y representados por los Carriles 7 y 13, respectivamente), no parecen mostrar ninguna fragmentación detectable después del empape en NaOH 0,5M durante 25 horas, lo que implica que ambos son estables en condiciones cáusticas.

40 El análisis por SDS-PAGE de los ligandos del dominio Z pentamérico inmovilizado después del empape cáustico prolongado (p. ej., empape con NaOH 0,5M durante 25 horas) se muestra en la Figura 5. Como se observa por el gel de SDS-PAGE en la Figura 5, el ligando del dominio Z pentamérico que contiene una delección en el extremo N en todos excepto en el primer dominio (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:84 y representado por el Carril 4 del gel de SDS-PAGE), muestra mucha menos fragmentación comparado con su control del dominio Z pentamérico wt (SEQ ID NO:91 y Carril 7). Este resultado sugiere que el ligando del dominio Z pentamérico inmovilizado que tiene delecciones en el extremo N es más estable en condiciones cáusticas comparado con el dominio Z pentamérico inmovilizado que no tiene dichas delecciones.

45 Además, la fragmentación de un ligando usado rutinariamente (es decir, rSPA) también se investigó por SDS-PAGE después de su inmovilización en una resina de cromatografía de agarosa y sometiendo la resina con el ligando a un empape prolongado en NaOH 0,5M durante 25 horas. Como se observa en el Carril 10 del gel de SDS-PAGE de la Figura 5, la rSPA inmovilizada muestra una fragmentación significativa después de empape en NaOH 0,5M durante 25 horas, lo que implica que no es muy estable en condiciones cáusticas, respecto a los ligandos del dominio Z pentamérico (Carriles 4 y 7).

Sobre la base de los resultados del gel de SDS-PAGE en la Figura 5, puede concluirse que el ligando del dominio Z pentamérico inmovilizado con las delecciones en el extremo N tiene la menor fragmentación después de una exposición cáustica prolongada y, por lo tanto, es más estable en condiciones cáusticas, comparado con el ligando control del dominio Z pentamérico inmovilizado y la rSPA inmovilizada.

55 Una confirmación adicional de los resultados de SDS-PAGE con los ligandos del dominio Z pentamérico inmovilizado y el ligando rSPA se obtiene por análisis por SEC. Los resultados de un experimento representativo se representan en el cromatograma mostrado en la Figura 7. Como se observa en la Figura 7, el ligando del dominio Z

5 inmovilizado de la SEQ ID NO:84 muestra una fragmentación reducida después de un empape cáustico prolongado, como se muestra por una caja, respecto a su equivalente wt de la SEQ ID NO:91, que muestra picos resueltos de menor peso molecular en el cromatograma. Además, como se esperaba, la rSPA inmovilizada muestra una fragmentación extensa después de un empape cáustico prolongado como se observa por picos anchos y no resueltos en el cromatograma.

Ejemplo 8: Medición de la Capacidad de Unión Estática de Matrices de Cromatografía a una Inmunoglobulina antes y después de la exposición a NaOH 0,5M durante 25 horas

10 Las matrices de cromatografía de afinidad (es decir, resinas que tienen las resinas inmovilizadas en ellas a través de unión de múltiples puntos) descritas anteriormente se ensayan adicionalmente para determinar su capacidad de unión estática antes y después de la exposición a NaOH 0,5M durante 25 horas.

15 En un experimento, cada una de las matrices de cromatografía (en 1 mL de volumen) inmovilizadas con los ligandos del dominio Z o C dimérico o pentamérico descritos anteriormente, bien con exposición a NaOH 0,1, 0,3 o 0,5M o sin exposición a NaOH, se prepara en una suspensión de sólidos al 10% en agua Milli-Q® (MILLIPORE, Billerica, MA). Se añade 1 mL de cada suspensión de sólidos a 15 mL de IgG policlonal (SERACARE, 1 mg/mL) en tampón de disolución salina con fosfato 10mM y se rota durante 4 horas a temperatura ambiente. La reducción de UV a 280 nm se usa para calcular la capacidad antes y después de la capacidad de unión en condiciones cáusticas. El porcentaje de capacidad de unión a IgG retenida se calcula dividiendo la capacidad de unión a IgG después de la exposición cáustica por la de sin exposición cáustica. La Tabla II resume los resultados de uno de dichos experimentos. Como se resume en la Tabla II, el ligando del dominio Z dimérico de la SEQ ID NO:78 parece presentar una capacidad de unión retenida mayor respecto a su equivalente wt (es decir, el ligando del dominio Z dimérico de la SEQ ID NO:85), después del empape cáustico prolongado en NaOH 0,5M durante 25 horas.

20 De forma similar, como también resume en la Tabla II siguiente, el ligando del dominio C dimérico de la SEQ ID NO:35 parece presentar una capacidad de unión retenida mayor que su equivalente wt de la SEQ ID NO:92, después del empape cáustico prolongado en NaOH 0,5M durante 25 horas.

25 **Tabla II**

Secuencia del Ligando inmovilizado en la matriz	Capacidad de unión estática a IgG retenida de la matriz (%)
SEQ ID NO: 85	64
SEQ ID NO: 78	70
SEQ ID NO: 92	65
SEQ ID NO: 35	70

En un experimento adicional, la capacidad de unión a IgG de un ligando del dominio Z pentamérico se evalúa después del empape cáustico prolongado en NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M durante 25 horas. Los resultados de uno de dichos experimentos se resumen en la Tabla III siguiente.

30 La Tabla III muestra el porcentaje de la capacidad de unión a IgG retenida de una matriz que tiene inmovilizado en ella una forma pentamérica del ligando del dominio Z que contiene una mutación A29K y todos excepto el primer dominio incluyen una delección de cuatro aminoácidos consecutivos del extremo N (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 84), después de empapar la matriz en NaOH 0,1M, NaOH 0,3M o NaOH 0,5M. Como se resume a continuación, la matriz con el ligando del dominio Z pentamérico con delección en el extremo N muestra hasta un 95% de la capacidad de unión inicial, después de empape en NaOH 0,1M durante 25 horas; hasta un 85% de la capacidad de unión inicial, después de empape en NaOH 0,3M durante 25 horas y hasta un 65% de la capacidad de unión inicial, después de empape en NaOH 0,5M durante 25 horas.

Concentración de NaOH (M)	Capacidad de unión estática a IgG retenida de la matriz inmovilizada con la SEQ ID 84 (%)
0,1	95
0,3	85
0,5	65

Ejemplo 9: Captura por SpA de IgG Antes y Después de la Exposición a NaOH 0,5M

5 En este experimento, la purificación de una inmunoglobulina policlonal en alimentación de CHO-S nula usando una matriz inmovilizada con un pentámero del ligando del dominio Z con todos excepto el primer dominio teniendo una delección de 4 aminoácidos consecutivos se examina junto con la que tiene una SpA sintetizada recombinantemente (rSPA) con el fin de demostrar que los ligandos según la presente invención funcionan tal bien como la SpA recombinante en la eliminación de impurezas.

10 Las muestras de resina inmovilizadas con rSPA (REPLIGEN, Waltham, MA) y el ligando pentamérico del dominio Z (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:84), se empaquetan cada una en una columna de cromatografía con un diámetro de 1 cm y una altura de lecho empaquetado de 5 cm. Después del equilibrado con tampón de disolución salina con fosfato (fosfato de sodio 10mM), las resinas empaquetadas se someten a exposición de alimentación de CHO nula con hlgG policlonal (SERACARE, 5 mg/mL) a una velocidad de flujo de 50 cm/hr. Después de cargar al 90% de 5% de ruptura, la resina se lava con tampón PBS y NaOAc 50mM, pH 5,5. La IgG unida se eluye posteriormente con NaOAc 50mM, pH 3. Se recogen fracciones y se analizan para analizar las impurezas. La resina empaquetada se expone entonces a NaOH 0,5M durante 15 minutos (velocidad de flujo 100 cm/hr) antes de ponerla en contacto de nuevo con hlgG policlonal en alimentación de CHO nula. Las resinas se lavan entonces con tampón PBS y NaOAc 50mM, pH 5,5 y la IgG se eluye para ensayo adicional.

15 Este ciclo de exposición cáustica y operación alimentación se repite para recoger suficiente IgG para la etapa de intercambio catiónico posterior. La proteína A lixiviada se cuantifica usando ELISA de n-Proteína A (REPLIGEN, Waltham, MA) según las instrucciones del fabricante. La proteína de la célula huésped se detecta usando el kit 3G CHO HCP ELISA (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC), según las instrucciones del fabricante. El ADN se detecta usando el Reactivo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (LIFE TECHNOLOGIES, Foster City, CA). Los resultados de uno de dichos experimentos representativos se muestran en la Tabla IV.

Ejemplo 10: Aclaramiento de los Ligandos SpA Lixiviados y Eliminación Adicional de ADN y Proteína de la Célula Huésped usando Cromatografía de Intercambio Catiónico e Intercambio Aniónico

25 Se examina como sigue el aclaramiento de los ligandos, así como la eliminación adicional de proteínas de las células huésped (HCP) y ADN del combinado de la elución de matrices de cromatografía de afinidad que incorporan bien los ligandos SpA según la presente invención o aquellos que contienen SpA recombinante, rSPA (REPLIGEN, Waltham, MA).

30 La combinación de los combinados de elución de varias repeticiones del experimento descrito en el Ejemplo 8 proporciona la alimentación para un aclaramiento adicional de los ligandos lixiviados y otras impurezas usando cromatografía de intercambio catiónico.

35 Se empaqueta Fractogel SO₃⁻ (MILLIPORE, Billerica, MA) en una columna con una dimensión de lecho de 1,0 cm (d.i.) x 7 cm (altura del lecho). La columna se equilibra con NaOAc 50mM pH 4,5, 4 mS/cm y se carga con la IgG combinada de la elución de la Proteína A a 140 cm/hr. Después de lavar la columna con tampón EQ, la IgG se eluye con NaCl 0,5N en NaOAc 50mM en 20 volúmenes de columna (gradiente lineal). Los combinados de la elución se recogen en fracciones de 10 mL y se analizan para determinar los ligandos lixiviados, ADN y proteína de la célula huésped.

40 Las fracciones de la columna Fractogel SO₃⁻ se combinan adicionalmente y se justan hasta pH 7,6 a 12 mS/cm. Esta alimentación se carga en un dispositivo ChromaSorb (0,08 mL, MILLIPORE, Billerica, MA) pre-equilibrado (Tris, 25mM, pH 7,6, ~1 mS/cm) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se recogen fracciones para cada 187 volumen de la columna y se analizan adicionalmente para ligando lixiviado y proteína de la célula huésped, como se describe en el Ejemplo 8.

45 Como se resume en la Tabla IV siguiente, tanto el ligando rSPA lixiviado, así como la forma pentamérica del dominio Z con todos excepto el primer dominio teniendo una delección en el extremo N de cuatro aminoácidos consecutivos (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID:84), pueden aclararse hasta menos de 1 PPM después de cromatografía de intercambio catiónico e intercambio aniónico. Además, la eliminación de proteínas y ADN de la célula huésped cumple con el estándar industrial y es más o menos equivalente en ambos casos, como también se resume en la Tabla siguiente.

Tabla IV

Ligando en la resina		rSPA	SEQ ID: 84
Proteína A lixiviada	Combinado de Proteína A	7,1	3,8
(PPM)	Combinado de intercambio catiónico	1,1	1,1
	Combinado de intercambio aniónico (a 1g/mL de carga)	0,6	1,0
Proteínas de la célula huésped	Alimentación	25.568	25.568
(PPM)	Combinado de Proteína A	232	133
	Combinado de intercambio catiónico	49	60
	Combinado de intercambio aniónico (a 1g/mL de carga)	3	7
ADN (PPM)	Alimentación	6,8	6,8
	Combinado de Proteína A	0,05	0,04
	Combinado de intercambio catiónico	0,03	0,03
	Combinado de intercambio aniónico (a	Por debajo	Por debajo
	1g/mL de carga)	del límite de detección	de del límite de detección

5 **Ejemplo 11: Efecto del Número de Deleciones de Aminoácidos en el Extremo N sobre la Fragmentación del Ligando Después de Empape Cáustico Prolongado**

En otro experimento, 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos se deleccionaron del extremo N del segundo dominio de un ligando del dominio Z dimerico, empezando en la posición 1 y se determinó el efecto de las deleciones de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos sobre la fragmentación del ligando del empape cáustico prolongado, comparado con el ligando del dominio Z dimerico control (A29K)

10 Los resultados de uno de dichos experimentos se representan en el cromatograma mostrado en la Figura 8. Como se demuestra en la Figura 8, el efecto sobre la fragmentación del número de residuos de aminoácidos que se deleccionaron del extremo N del segundo dominio del ligando del dominio Z dimerico puede observarse después del empape cáustico prolongado de cada uno de los ligandos en NaOH 0,5M durante 25 horas seguido de análisis por SEC, como se describe en el Ejemplo 5.

15 Después de empapar los ligandos en NaOH 0,5M durante 25 horas, cada uno del ligando control (SEQ ID NO:85), el ligando con solo el primer aminoácido deleccionado del extremo N del segundo dominio (SEQ ID NO:87) y el ligando con los dos primeros aminoácidos deleccionados del extremo N del segundo dominio (SEQ ID NO:88) muestra fragmentos a un peso molecular menor, como se representa por las flechas, evidenciando fragmentación. Mientras, el ligando con los tres primeros aminoácidos deleccionados del extremo N del segundo dominio (SEQ ID NO:69) y el
 20 ligando con los cuatro primeros aminoácidos deleccionados del extremo N del segundo dominio (SEQ ID NO:78) mostraron una fragmentación reducida significativamente a un peso molecular menor como se representa por cajas en el cromatograma, evidenciando una fragmentación reducida.

Estos resultados sugieren que los ligandos de afinidad basados en uno o más dominios de la Proteína A y que tienen al menos 3 aminoácidos deleccionados del extremo N de uno o más dominios presentan una fragmentación

reducida después de la exposición cáustica prolongada, son candidatos superiores para uso como ligandos de cromatografía de afinidad.

Ejemplo 12: Comparación de la Capacidad de Unión Retenida de pentámeros del dominio C con Deleción en el Extremo N y de Tipo Salvaje, teniendo ambos una mutación no Fab (G29K)

5 En este experimento, se examina la capacidad de unión retenida de dos ligandos pentaméricos del dominio C inmovilizados en una matriz de cromatografía basada en polivinil alcohol, teniendo un ligando una deleción en el extremo N (empezando en la posición 1) de 4 aminoácidos en cada uno de los 5 dominios, una alanina como el primer aminoácido de la secuencia pentamérica con el fin de facilitar el procesamiento homogéneo posterior a la traducción así como la mutación G29K (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:93) y el otro ligando correspondiendo a su equivalente wt con la mutación G29K (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:95).

10 Los ligandos se inmovilizan en resinas de cromatografía de afinidad basadas en polivinil alcohol a través de la unión de múltiples puntos (véase, p. ej., Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, p. 51-136 (1992)) y se ensayan para determinar la capacidad de unión dinámica retenida después de la exposición repetida a NaOH.

15 En un experimento, las matrices de cromatografía se empaquetan en columnas (0,66 cm *d.i.* x 1,0 cm de altura de lecho) y se someten a una operación cromatográfica estándar con equilibrado seguido de la aplicación de 30 mg de IgG humana policlonal (hIgG) a 60 cm/hr. Después de una eliminación por lavado extensa de proteínas no unidas con tampón de equilibrado (disolución salina con tampón fosfato 10mM), la IgG unida se eluye con tampón de elución (ácido cítrico 0,1M, pH 3) a 60 cm/hr. Esto se sigue de limpieza "in situ" (CIP) con NaOH 0,7M durante 30 mins. La columna se reequilibra y la operación se repite 16 veces más (una exposición acumulativa a NaOH 0,7M durante 8 hrs). La capacidad de unión retenida se mide determinando la cantidad total de IgG eluida (volumen de elución multiplicado por la concentración de IgG medida a UV₂₈₀) con el tiempo. La capacidad retenida relativa se representa gráficamente frente a la primera operación con una exposición de 0 min a NaOH y se muestra en la Figura 9. Este experimento se repite 3 veces con resultados similares. Como se demuestra en la Figura 9, ambos ligandos pentaméricos del dominio C, con y sin la deleción, muestran una capacidad de unión retenida similar después de la exposición prolongada a NaOH con el tiempo. Además, en otro experimento, la capacidad de unión retenida del ligando pentamérico del dominio C sin la alanina y que tiene la mutación G29K (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:80) se compara con su equivalente wt con la mutación G29K (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO:95), con un resultado similar (datos no mostrados).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EMD MILLIPORE CORPORATION

35 <120> MATRICES DE CROMATOGRAFÍA QUE INCLUYEN NUEVOS LIGANDOS BASADOS EN LA PROTEÍNA A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

<130> P12380EP00

40 <140>
<141>

<150> 61/494.701
<151> 08-06-2011

45 <160> 96

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1
<211> 51
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

55 <400> 1

ES 2 671 722 T3

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

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

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

<210> 3

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

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

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

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 4

ES 2 671 722 T3

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

<210> 5

<211> 61

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 5

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

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 6

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

<210> 7

<211> 159

<212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 7

ES 2 671 722 T3

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

<210> 8
<211> 174
5 <212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 8

gccgacaaca acttcaacaa agagcagcaa aacgctttct acgaaatcct gaatatgcca 60
aatctgaacg aagagcagcg taacggtttc atccaatctc tgaaagacga tccgtcccag 120
10 tccgcgaatc tgctggcgga ggctaaaaag ctgaacgaat cccaggctcc gaaa 174

<210> 9
<211> 174
15 <212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 9

gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcatctgccg 60
aacctgaacg aagaacaacg caacggtttc attcagagcc tgaaagacga cccatctcag 120
20 tccgctaacc tgctggcgga agcaaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

<210> 10
<211> 174
<212> ADN
25 <213> Staphylococcus aureus

<400> 10

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

<210> 11
<211> 177
30 <212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 11

gcccacaga acaaatttaa caagaccag cagtccgcgt tctacgagat tctgaacatg 60
cctaacctga atgaagaaca gcgcaacggt tttattcagt ctctgaagga cgatectttc 120
caatccacca acgtactggg cgaagcgaag aaactgaacg aatctcaggc tccgaag 177

<210> 12
40 <211> 174
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

ES 2 671 722 T3

<400> 12

gtagacaaca aattcaataa agaacagcag aacgctttct atgaaatcct gcacctgccg 60
aacctgaacg aagaacagcg taacgcgttt atccagtccc tgaagacga cccgagccag 120
agcgcaaatc tgctggcgga agcgaaaaag ctgaacgatg cccagggccc gaaa 174

5 <210> 13
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 13

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

20 <210> 14
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

30 <210> 15
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 671 722 T3

<400> 15

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

5 <210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

20 <210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 17

ES 2 671 722 T3

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

5 <210> 18
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 18

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

20 <210> 19
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 671 722 T3

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

5

<400> 19

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
85 90 95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

10 Lys

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20

<400> 20

ES 2 671 722 T3

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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys

<210> 21

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21

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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
85 90 95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys

15

ES 2 671 722 T3

<210> 22
<211> 275
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 22

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala

ES 2 671 722 T3

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
 65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
 85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe
 100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
 115 120 125

Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 130 135 140

Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
 195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys
 210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 245 250 255

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 260 265 270

Ala Pro Lys
 275

5 <210> 24
 <211> 275

ES 2 671 722 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 24

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 65 70 75 80

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe
 100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
 115 120 125

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 165 170 175

10

ES 2 671 722 T3

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys
 210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 245 250 255

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 260 265 270

Ala Pro Lys
 275

<210> 25

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
 20 25 30

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln
 50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
 85 90 95

15

ES 2 671 722 T3

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
 100 105 110

Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 115 120 125

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
 180 185 190

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
 195 200 205

Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys
 210 215 220

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 245 250 255

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 275

<210> 26

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 26

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

15

ES 2 671 722 T3

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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
115 120 125

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg
180 185 190

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu
195 200 205

Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys
210 215 220

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
225 230 235 240

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
245 250 255

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
275

<210> 27

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 27

ES 2 671 722 T3

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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
 50 55 60
 Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
 65 70 75 80
 Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
 85 90 95
 Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
 100 105 110
 Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 115 120 125
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
 130 135 140
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 165 170 175
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
 180 185 190
 Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
 195 200 205
 Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys
 210 215 220
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 225 230 235 240
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 245 250 255
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 260 265 270
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 275

ES 2 671 722 T3

<210> 28
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 10 <400> 28
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50
 15 <210> 29
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 29
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15
 25 Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30
 Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50
 30 <210> 30
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 30

ES 2 671 722 T3

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50

<210> 31
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 31

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105

<210> 32
20 <211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 32

ES 2 671 722 T3

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105

<210> 33
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 33

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105

<210> 34
<211> 112
20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 671 722 T3

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 34

5

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

<210> 35

<211> 112

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35

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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys
 85 90 95
 Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

20

ES 2 671 722 T3

<210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 36

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	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln
	50					55					60				
Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln
65					70					75					80
Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala
				85					90					95	
Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys
			100					105						110	

15

<210> 37
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 37

ES 2 671 722 T3

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 50 55 60
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
 65 70 75 80
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 85 90 95
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
 100 105 110
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
 115 120 125
 Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 130 135 140
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 165 170 175
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 180 185 190
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 195 200 205
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 210 215 220
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 225 230 235 240
 Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 245 250 255
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 260 265 270

5 <210> 38
 <211> 270
 <212> PRT

ES 2 671 722 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 38

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
115 120 125

10

ES 2 671 722 T3

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
 130 135 140

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 145 150 155 160

Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 165 170 175

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 180 185 190

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 195 200 205

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 210 215 220

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
 225 230 235 240

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
 245 250 255

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 260 265 270

<210> 39

<211> 270

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 39

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe

15

ES 2 671 722 T3

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln
50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
115 120 125

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
130 135 140

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
245 250 255

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
260 265 270

Pro Lys

- 5 <210> 41
- <211> 274
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <221> fuente

ES 2 671 722 T3

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys
 85 90 95

Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 115 120 125

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 130 135 140

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
 195 200 205

5

ES 2 671 722 T3

Gln Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
 210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
 245 250 255

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 260 265 270

Pro Lys

<210> 42

<211> 274

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42

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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 115 120 125

15

ES 2 671 722 T3

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 130 135 140

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
 210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 245 250 255

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 260 265 270

Pro Lys

<210> 43

<211> 51

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 43

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 Lys 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

10

<210> 44

<211> 58

<212> PRT

15 <213> Staphylococcus aureus

<400> 44

ES 2 671 722 T3

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 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 Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 45

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

<210> 46

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 46

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 Lys 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

<210> 47

<211> 61

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 47

ES 2 671 722 T3

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 Lys
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

<210> 48
<211> 58
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

5

<400> 48

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 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

10

<210> 49
<211> 159
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

15

<400> 49

gcgcaacaaa acgctttcta tcaggtactg aacatgccta acctgaacgc cgatcagcgt 60

aacaaattca tccaaagcct gaaggacgac ccgagccagt ccgcaaact tctgggtgaa 120

gctcaaaaac tgaacgacag ccaggcaccg aaagetgac 159

20

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

25

<400> 50

gccgacaaca acttcaaca agagcagcaa aacgctttct acgaaatcct gaatatgcca 60

aatctgaacg aagagcagcg taacaaattc atccaatctc tgaaagacga tccgtcccag 120

tccgcgaatc tgctggcgga ggctaaaaag ctgaacgaat cccaggctcc gaaa 174

30

<210> 51
<211> 174
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

35

<400> 51

ES 2 671 722 T3

gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcacctgccg 60
aacctgaacg aagaacaacg caacaaattc atccagagcc tgaagacga cccatctcag 120
tccgctaacc tgctggcgga agcaaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

5 <210> 52
<211> 174
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

10 <400> 52
gcggataaca aattcaacaa ggagcaacag aacgcattct atgaaattct gcacctgccg 60
aatctgacgg aggagcaacg taacaaattt atccagtcct tgaaggatga tccgtctgtg 120
tctaaagaga tcttggcgga ggcaaaaaaa ctgaatgatg cacaagctcc gaaa 174

15 <210> 53
<211> 177
<212> ADN
<213> Staphylococcus aureus

<400> 53
gccaacaga acaaatttaa caaagaccag cagtccgctg tctacgagat tctgaacatg 60
cctaacctga atgaagaaca gcgcaacaaa tttattcagt ctctgaagga cgatccttct 120
20 caatccacca acgtactggg cgaagcgaag aaactgaacg aatctcaggc tccgaag 177

<210> 54
<211> 174
<212> ADN
25 <213> Staphylococcus aureus

<400> 54
gtagacaaca aattcaataa agaacagcag aacgctttct atgaaatcct gcacctgccg 60
aacctgaacg aagaacagcg taacaaattt atccagtcct tgaagacga cccgagccag 120
30 agcgcaaatac tgctggcgga agcgaaaaag ctgaacgatg cccaggcgcc gaaa 174

<210> 55
<211> 55
<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

40 <400> 55

ES 2 671 722 T3

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

5 <210> 56
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 56

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

15 <210> 57
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 57

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

30 <210> 58
 <211> 110
 <212> PRT

ES 2 671 722 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 58

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

10

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20

<400> 59

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu

ES 2 671 722 T3

35

40

45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

<210> 60

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 60

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

15 <210> 61

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 61

ES 2 671 722 T3

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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
85 90 95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys

<210> 62

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 62

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 Lys 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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

15 Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys

ES 2 671 722 T3

<210> 63
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 63

```

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 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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
          50          55          60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
65          70          75          80

Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
          85          90          95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
          100          105          110
  
```

Lys

15 <210> 64
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 64

ES 2 671 722 T3

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe
100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
115 120 125

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
130 135 140

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys
210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
245 250 255

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
260 265 270

Ala Pro Lys
275

5 <210> 65
<211> 275
<212> PRT

ES 2 671 722 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 65

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe
100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
115 120 125

Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
130 135 140

Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
165 170 175

10

ES 2 671 722 T3

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
 195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys
 210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 245 250 255

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 260 265 270

Ala Pro Lys
 275

<210> 66

<211> 275

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 66

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

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe
 100 105 110

15

ES 2 671 722 T3

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
 115 120 125

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys
 210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 245 250 255

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 260 265 270

Ala Pro Lys
 275

<210> 67

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 67

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

15

ES 2 671 722 T3

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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
85 90 95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
115 120 125

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
180 185 190

Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
195 200 205

Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys
210 215 220

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
225 230 235 240

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
245 250 255

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
275

<210> 68

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 68

ES 2 671 722 T3

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 Lys 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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
 50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
 85 90 95

Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
 100 105 110

Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 115 120 125

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg
 180 185 190

Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu
 195 200 205

Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys
 210 215 220

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 245 250 255

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 275

5

<210> 69

ES 2 671 722 T3

<211> 278
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 69

10
 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 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 Lys Phe Asn Lys Glu Gln
 50 55 60
 Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
 65 70 75 80
 Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser
 85 90 95
 Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
 100 105 110
 Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 115 120 125
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu
 130 135 140
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys

ES 2 671 722 T3

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50

5 <210> 72
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 72

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30

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

15 Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50

20 <210> 73
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 73

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15

ES 2 671 722 T3

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
 65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105

<210> 74

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 74

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
 65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
 85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105

15 <210> 75

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 671 722 T3

<400> 75

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

5 <210> 76
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 76

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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 85 90 95
 Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

20 <210> 77
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 671 722 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

5

<400> 77

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 Lys 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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys
 85 90 95

Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

10

<210> 78
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20

<400> 78

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 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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

ES 2 671 722 T3

<210> 79
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 79

```

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1          5          10          15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20          25          30

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
50          55          60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
65          70          75          80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
85          90          95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
100         105         110

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
  
```

ES 2 671 722 T3

115 120 125

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
130 135 140

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
145 150 155 160

Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
165 170 175

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu
180 185 190

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
195 200 205

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
210 215 220

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
225 230 235 240

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
245 250 255

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
260 265 270

<210> 80
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 80

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
50 55 60

5

10

15

ES 2 671 722 T3

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
115 120 125

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
130 135 140

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
145 150 155 160

Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
165 170 175

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu
180 185 190

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
195 200 205

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
210 215 220

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
225 230 235 240

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
245 250 255

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
260 265 270

<210> 81

<211> 270

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 81

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro

15

ES 2 671 722 T3

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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 115 120 125

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 130 135 140

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
 210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
 225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 245 250 255

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 260 265 270

Pro Lys

5 <210> 83
 <211> 274

ES 2 671 722 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 83

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 Lys 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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys
 85 90 95

Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 115 120 125

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 130 135 140

10

ES 2 671 722 T3

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
245 250 255

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
260 265 270

Pro Lys

<210> 84

<211> 274

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 84

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 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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
50 55 60

15

ES 2 671 722 T3

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
65 70 75 80

Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
115 120 125

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
130 135 140

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe
180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu
210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
245 250 255

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
260 265 270

Pro Lys

<210> 85

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 85

ES 2 671 722 T3

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 Val Asp Asn Lys Phe Asn
50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80

Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
85 90 95

Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
100 105 110

Gln Ala Pro Lys
115

<210> 86

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 86

catcaccatc atcaccac 18

15

<210> 87

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25

<400> 87

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

ES 2 671 722 T3

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 Asp Asn Lys Phe Asn Lys
 50 55 60

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn
 65 70 75 80

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 100 105 110

Ala Pro Lys
 115

<210> 88

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 88

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 Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
 50 55 60

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
 65 70 75 80

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 85 90 95

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 100 105 110

15 Pro Lys

<210> 89

<211> 112

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

ES 2 671 722 T3

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 89

Ala Asp Asn Lys 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 Phe Asn Lys Glu Gln Gln
50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
85 90 95

5 Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
100 105 110

<210> 90

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15

<400> 90

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser 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 Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln
50 55 60

Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr
85 90 95

20 Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
100 105 110

<210> 91

<211> 290

ES 2 671 722 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 91

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 Val Asp Asn Lys Phe Asn
 50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
 65 70 75 80

Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
 85 90 95

Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 115 120 125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn
 130 135 140

10 Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu

ES 2 671 722 T3

145 150 155 160

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
165 170 175

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
180 185 190

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
195 200 205

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
210 215 220

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
225 230 235 240

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu
245 250 255

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
260 265 270

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
275 280 285

Pro Lys
290

<210> 92

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 92

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 Ala Asp Asn Lys Phe Asn
50 55 60

15

ES 2 671 722 T3

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
85 90 95

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
100 105 110

Gln Ala Pro Lys
115

<210> 93

<211> 271

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 93

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

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe
50 55 60

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys
65 70 75 80

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu
85 90 95

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys
100 105 110

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
115 120 125

Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
130 135 140

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln

15

ES 2 671 722 T3

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys
 100 105 110

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
 115 120 125

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 130 135 140

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 145 150 155 160

Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 165 170 175

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 180 185 190

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys
 195 200 205

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 210 215 220

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg
 225 230 235 240

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu
 245 250 255

Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 260 265 270

<210> 95

<211> 290

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 95

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 Lys Phe Ile Gln
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

15

ES 2 671 722 T3

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 Ala Asp Asn Lys Phe Asn
 50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
 85 90 95

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 115 120 125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
 130 135 140

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp
 165 170 175

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 180 185 190

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 195 200 205

ES 2 671 722 T3

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
210 215 220

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
225 230 235 240

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
245 250 255

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
260 265 270

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
275 280 285

Pro Lys
290

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una matriz de cromatografía de afinidad que comprende un soporte sólido con un ligando de cromatografía de afinidad que comprende uno o más dominios C de la Proteína A de *Staphylococcus* (SpA) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO.: 4 o codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO.: 10, en la que al menos uno del uno o más dominios C está mutado para delecionar 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos del extremo N, empezando en la posición 1 o en la posición 2 de la SEQ ID NO.:4 y el último aminoácido del extremo C de al menos uno del uno o más dominios C es una lisina en la posición 58 de la SEQ ID NO.:4;
- 10 en la que el ligando presenta una fragmentación reducida cuando se une al soporte sólido, respecto a un ligando sin delecciones o un equivalente wt, después de la exposición a NaOH 0,5M durante 5 horas.
2. La matriz de cromatografía de afinidad según la reivindicación 1, en la que el uno o más dominios del ligando comprenden además una mutación de aminoácido en la posición 29 para reducir la unión a Fab.
3. La matriz de cromatografía de afinidad según la reivindicación 2, en la que la mutación de aminoácido comprende reemplazar un residuo de aminoácido glicina en la posición 29 con un residuo de aminoácido lisina.
- 15 4. La matriz de cromatografía de afinidad según la reivindicación 1, en la que el ligando comprende dos o más dominios C de SpA.
5. La matriz de cromatografía de afinidad según la reivindicación 1, en la que el ligando comprende al menos cinco dominios C, en la que cada uno de los dominios comprende una mutación para reducir la unión a Fab, así como una delección de 4 aminoácidos del extremo N, empezando en la posición 1.
- 20 6. La matriz de cromatografía de afinidad según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ligando de la cromatografía de afinidad se une al soporte sólido a través de una unión de múltiples puntos.
7. La matriz de cromatografía de afinidad según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la matriz retiene al menos el 95% de su capacidad de unión inicial después de 5 horas de incubación en NaOH 0,5M.
- 25 8. La matriz de cromatografía de afinidad según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la matriz retiene al menos el 95% de su capacidad de unión inicial después de 25 horas de incubación en NaOH 0,1M.
9. La matriz de cromatografía de afinidad según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en vidrio con poro controlado, sílice, óxido de circonio, óxido de titanio, agarosa, polimetacrilato, poliácido, poliácridamida, poliviniléter, polivinil alcohol y poliestireno y derivados de estos.
- 30 10. Un método para purificar por afinidad una o más moléculas diana de una muestra, comprendiendo el método las etapas de:
- a) proporcionar una muestra que comprende una o más moléculas diana;
- b) poner en contacto la muestra con la matriz según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en condiciones tales que la una o más moléculas diana se unan a la matriz; y
- 35 c) recuperar una o más moléculas diana unidas por elución.

E	-----AQQNAFYQVILNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK	51	(SEQ ID NO: 1)
D	ADAQQNKFNKDQQSAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK	61	(SEQ ID NO: 5)
A	--ADNN-FNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNESQAPK	58	(SEQ ID NO: 2)
B	---ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	58	(SEQ ID NO: 3)
C	----ADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKELLAEAKKLNDAQAPK	58	(SEQ ID NO: 4)
Z	----VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	58	(SEQ ID NO: 6)

Figura 1. alineamiento de secuencias de aminoácidos

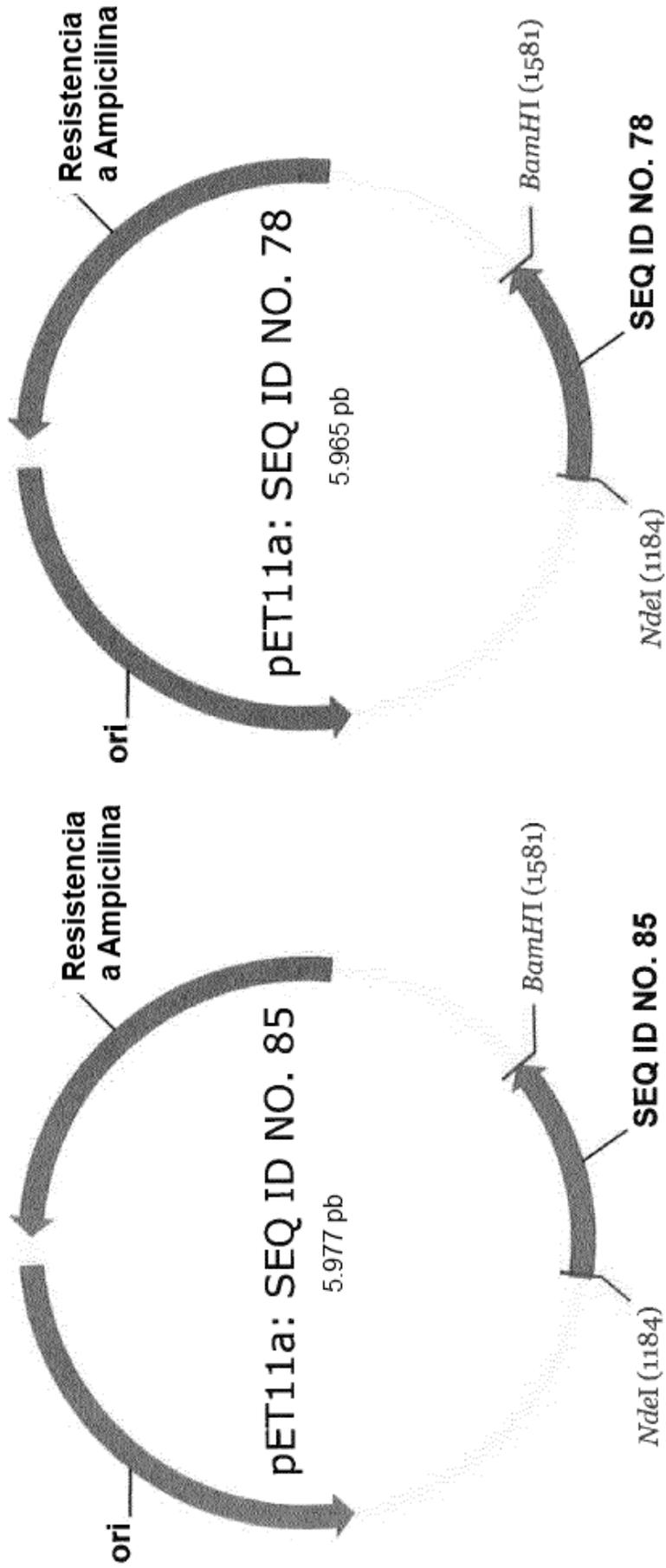


Figura 2. mapa plasmidico

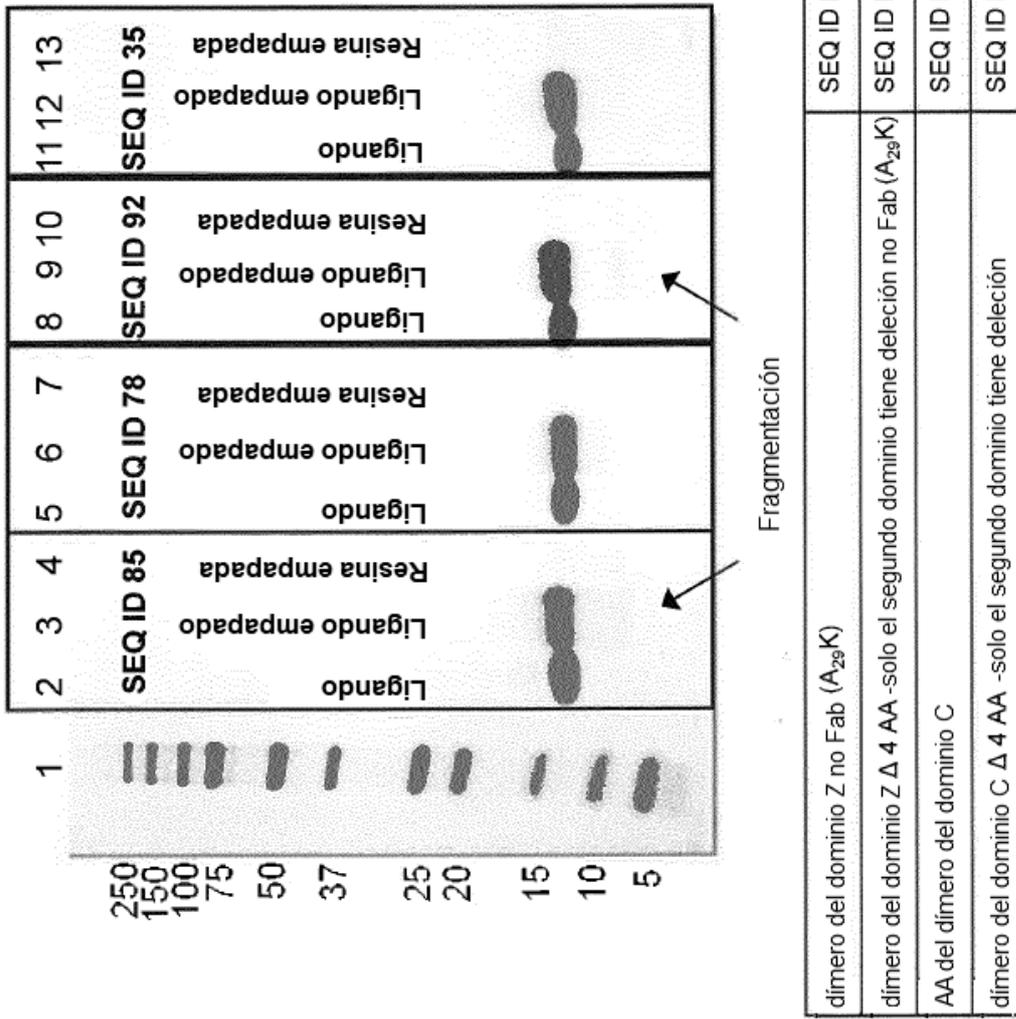


Figura 3. comparación de SDS-PAGE de ligandos (antes y después del empape cáustico prolongado) y ligandos inmovilizados (después del empape cáustico prolongado)

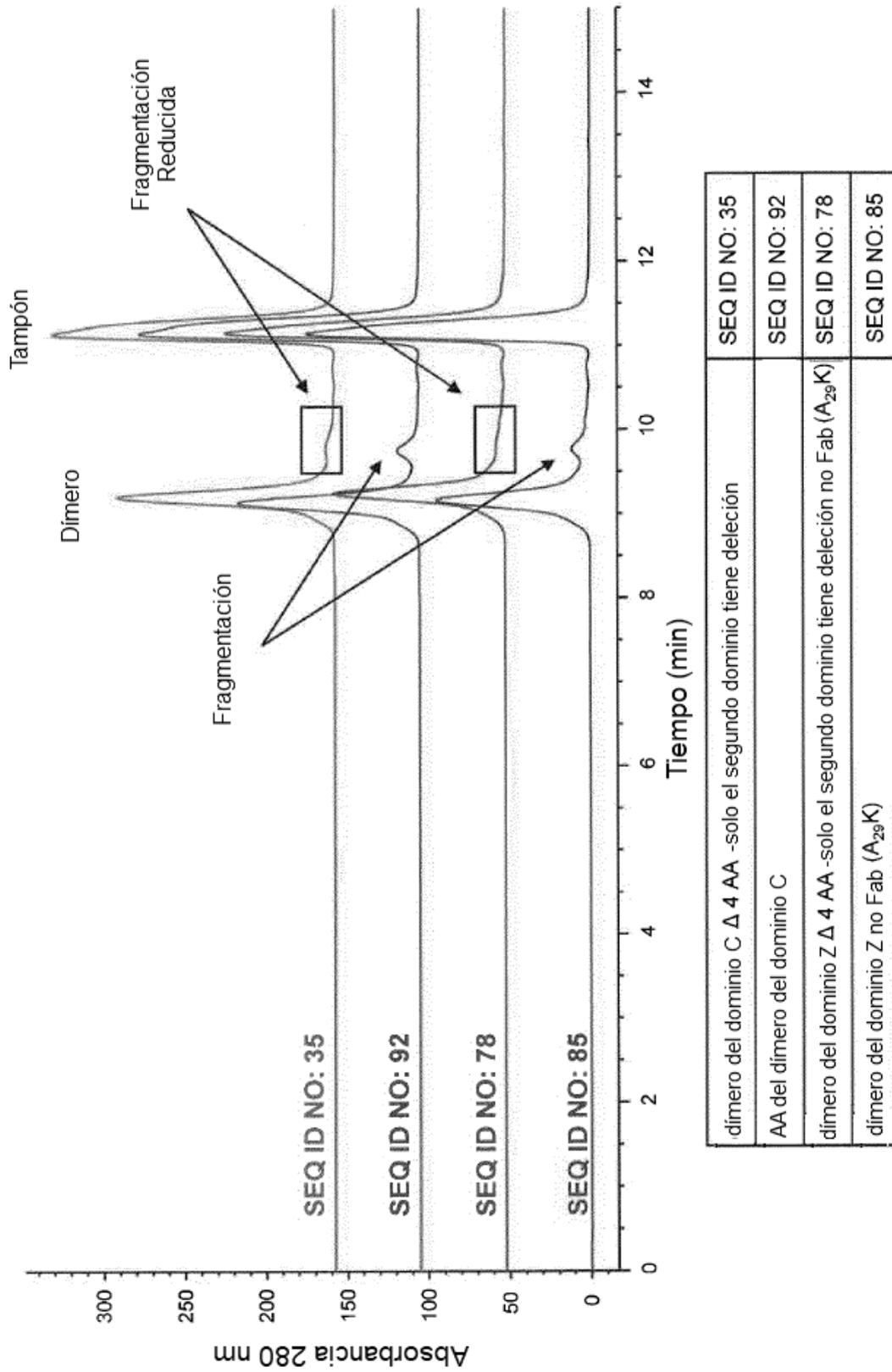


Figura 4. comparación de SEC de ligandos después de empape cáustico prolongado

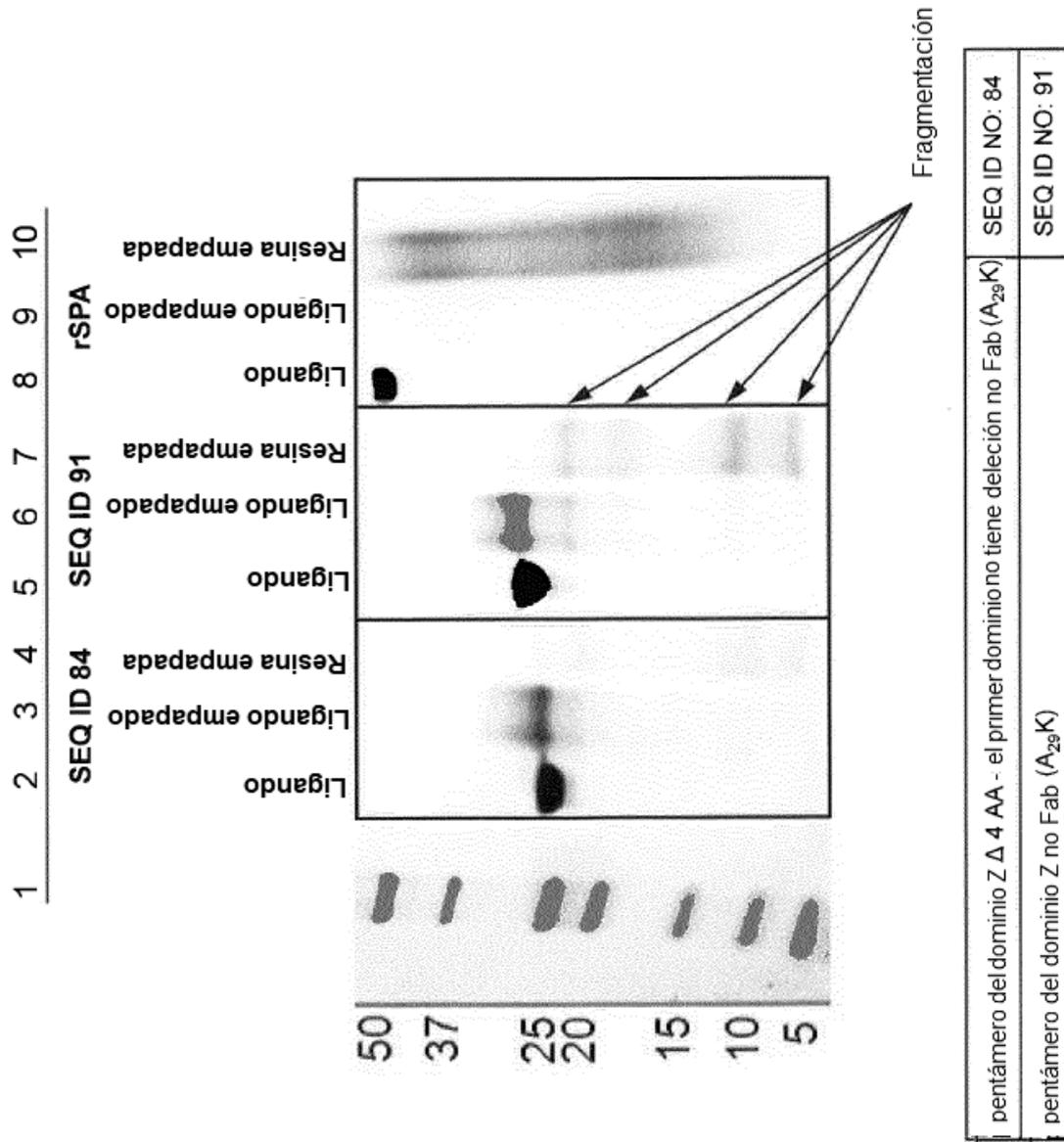


Figura 5. comparación de SDS-PAGE de ligandos (antes y después de empape cáustico prolongado) y ligandos inmovilizados (después de empape cáustico prolongado)

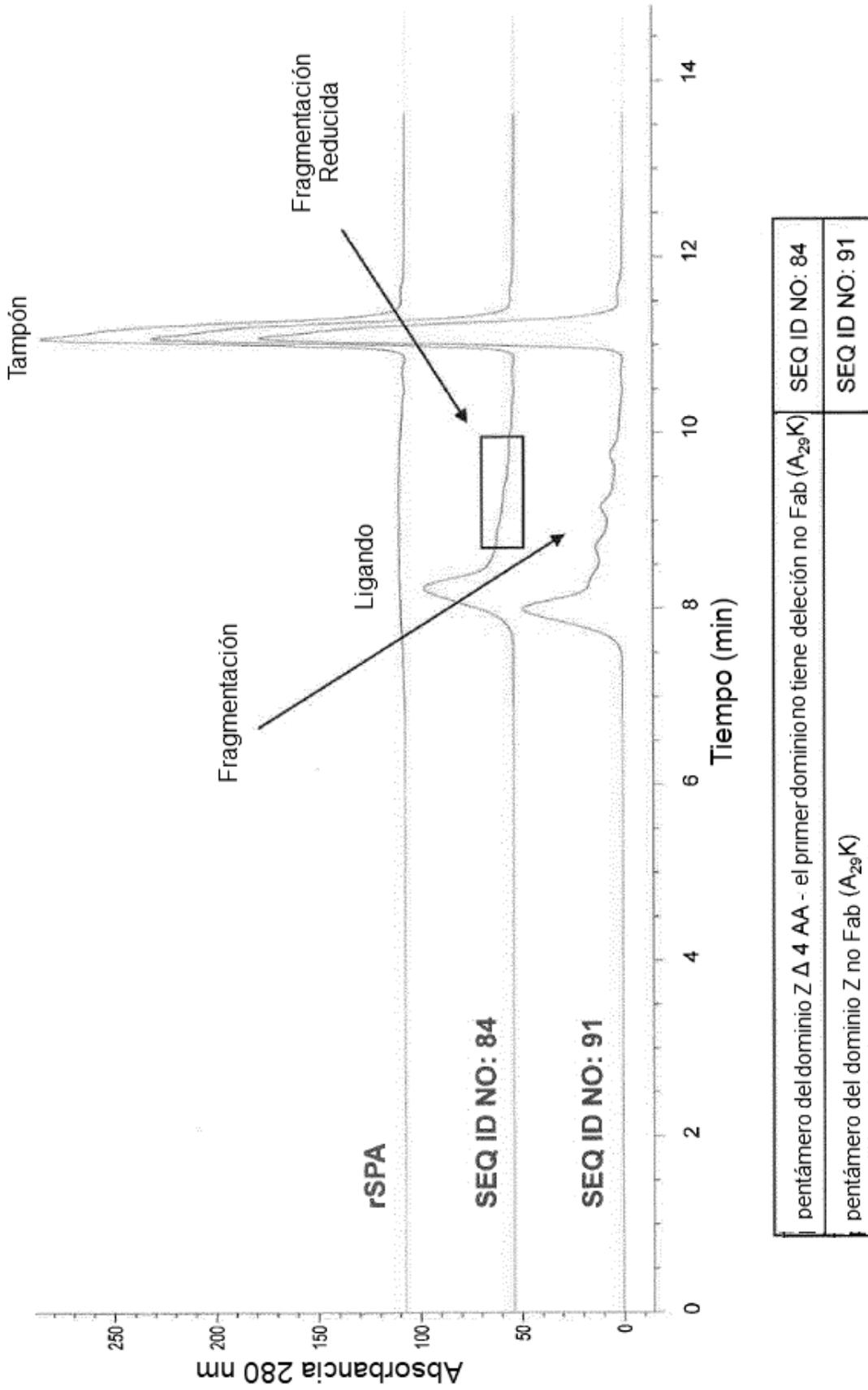


Figura 6. comparación de SEC de ligandos después de empape prolongado

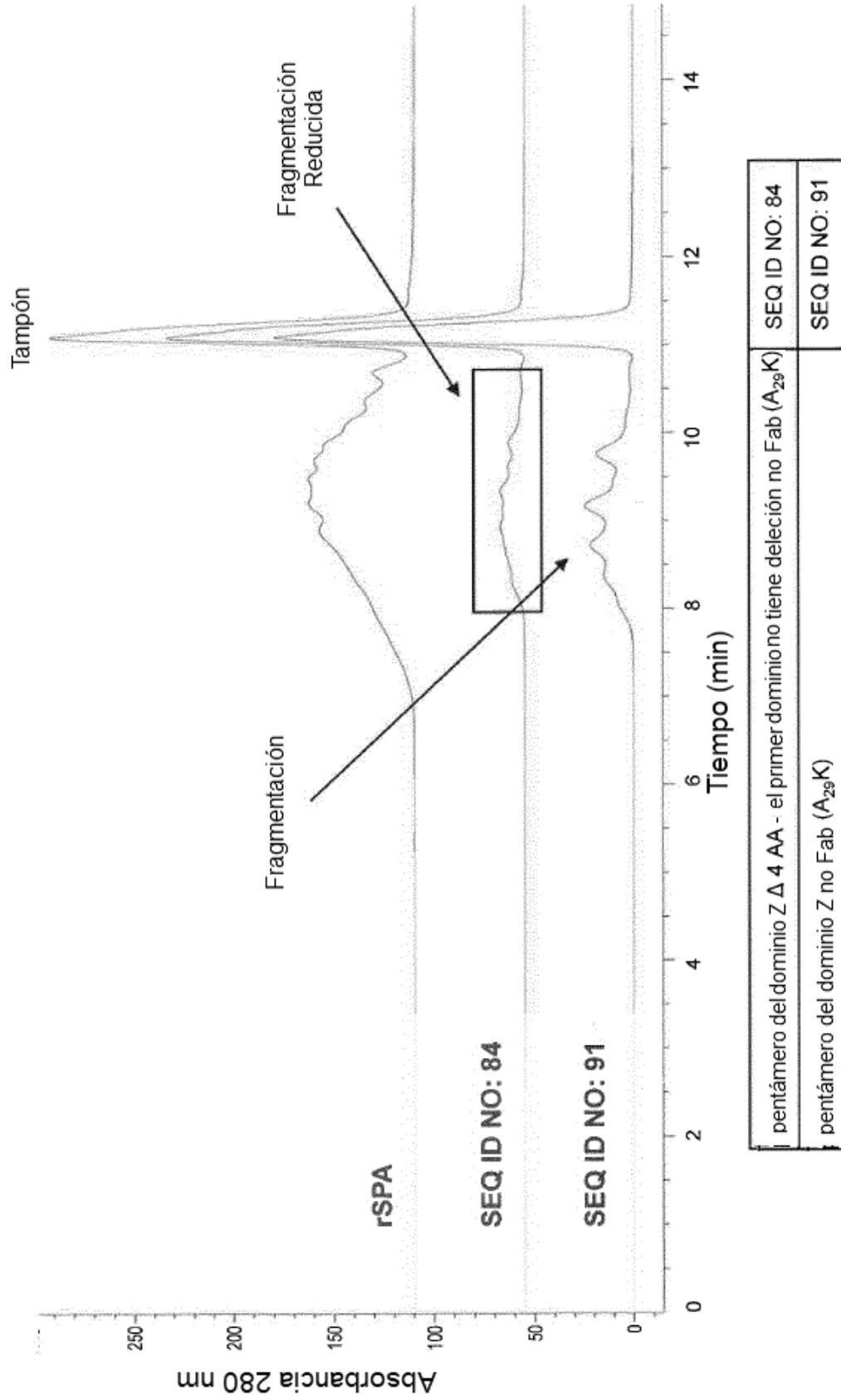


Figura 7. comparación de SEC de ligandos inmovilizados después de empape cónico prolongado

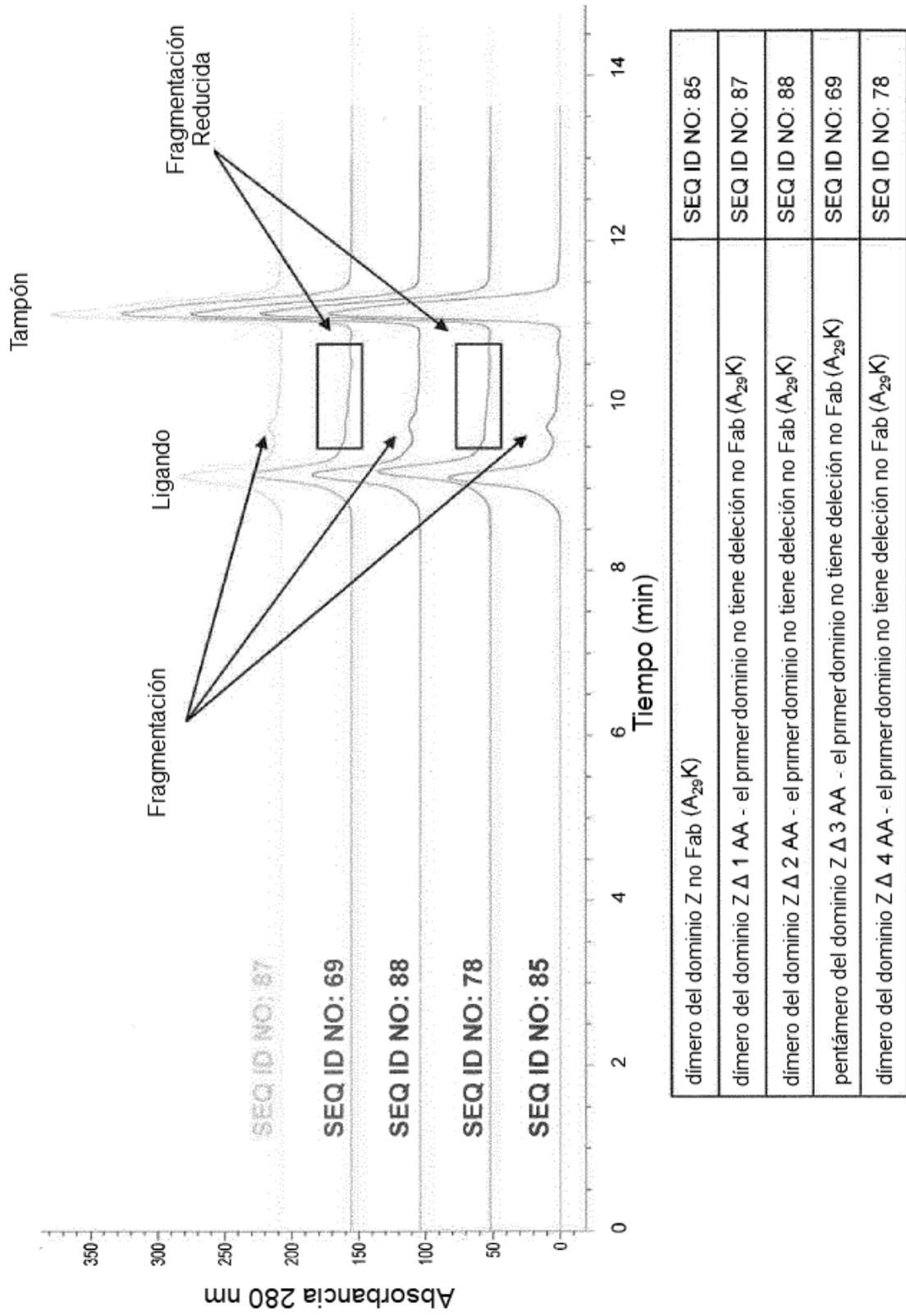


Figura 8. comparación de SEC de ligandos después de empape cásutico prolongado

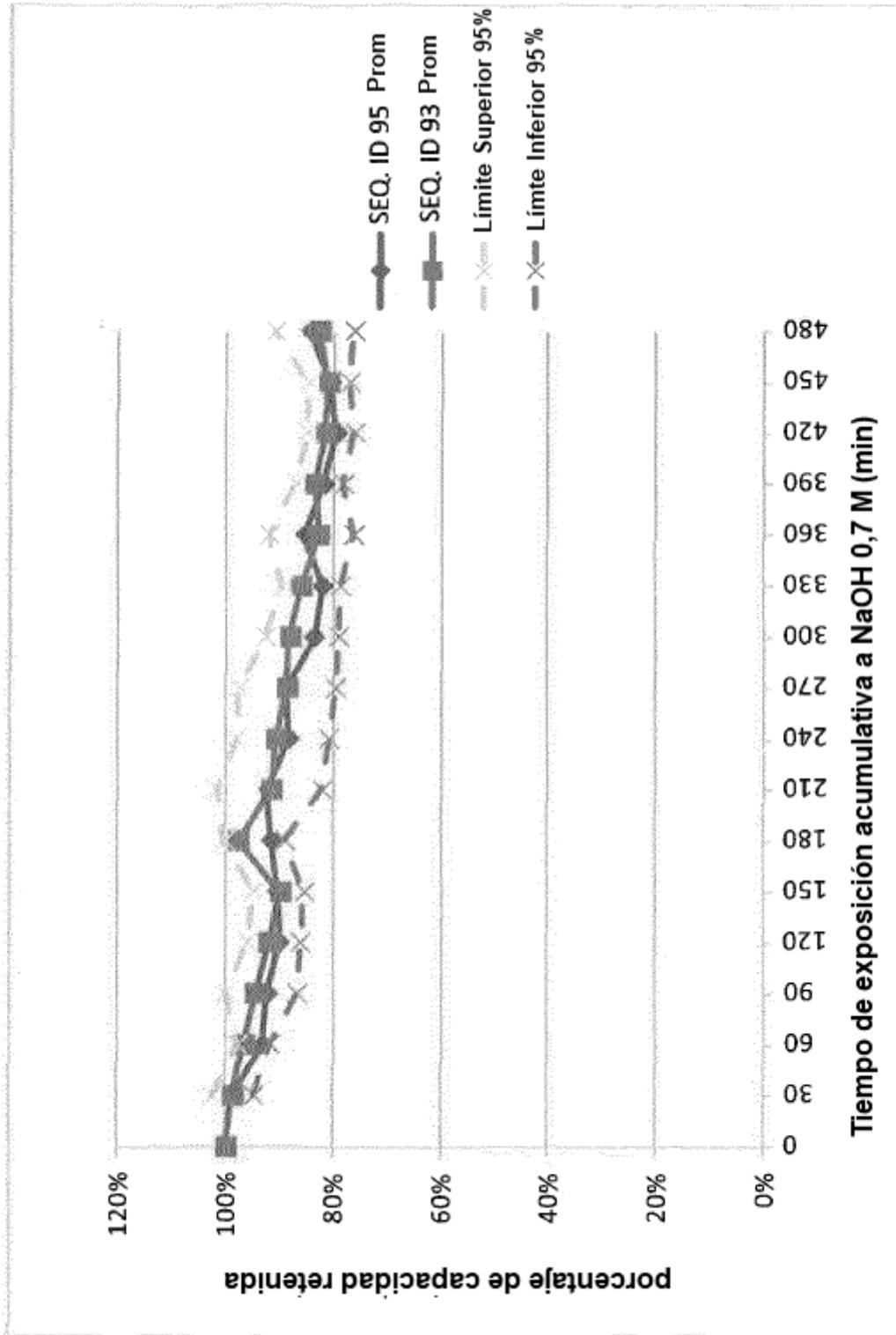


Figura 9.