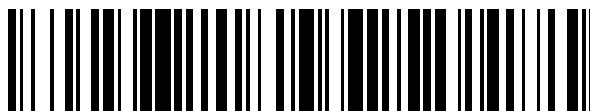


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 974**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/31** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2017 PCT/EP2017/061164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2017 WO17194597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2017 E 17727808 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3455243**

54 Título: **Matriz de separación**

30 Prioridad:

**11.05.2016 GB 201608229**  
**11.05.2016 GB 201608232**  
**30.09.2016 US 201615282367**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.11.2021**

73 Titular/es:

**CYTIVA BIOPROCESS R&D AB (100.0%)**  
**Björkgatan 30**  
**751 84 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**RODRIGO, GUSTAV JOSÉ;**  
**BJORKMAN, TOMAS;**  
**ANDER, MATS y**  
**HANSSON, JESPER ULF**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 874 974 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

Matriz de separación

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la cromatografía de afinidad y, más específicamente, a dominios de unión a inmunoglobulina mutados de la proteína A, que son útiles en la cromatografía de afinidad de inmunoglobulinas. La invención también se refiere a multímeros de los dominios mutados y a matrices de separación que contienen los dominios mutados o multímeros.

**Antecedentes de la invención**

10 Las inmunoglobulinas representan los productos biofarmacéuticos más habituales en las áreas de la fabricación o el desarrollo a nivel mundial. La alta demanda comercial y, por tanto, el valor de este mercado de productos terapéuticos concreto ha conducido a que las empresas farmacéuticas enfatizen la maximización de la productividad de sus respectivos procesos de fabricación de mAb, al mismo tiempo que controlan los costes asociados.

15 En la mayoría de los casos se usa la cromatografía de afinidad como una de las etapas clave en la purificación de estas moléculas de inmunoglobulina, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales. Una clase particularmente interesante de reactivos de actividad son las proteínas capaces de unirse específicamente a partes invariables de una molécula de inmunoglobulina, y dicha interacción es independiente de la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Estos reactivos pueden usarse ampliamente para la recuperación de inmunoglobulinas de diferentes muestras mediante cromatografía de afinidad, tales como, pero sin limitarse a preparaciones de suero o plasma o materias primas derivadas de cultivos celulares. Un ejemplo de dicha proteína es la proteína A estafilocócica, que  
20 contiene dominios capaces de unirse a las porciones Fc y Fab de inmunoglobulinas IgG procedentes de diferentes especies. Estos dominios se denominan habitualmente dominios E, D, A, B y C.

25 Los reactivos basados en la proteína A estafilocócica (SpA), debido a su alta afinidad y selectividad, se utilizan mucho en el campo de la biotecnología, por ejemplo, en la cromatografía de afinidad para la captura y la purificación de anticuerpos, así como para la detección o la cuantificación. En la actualidad, el medio de afinidad basado en SpA es, probablemente, el medio de afinidad más usado para el aislamiento de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de diferentes muestras, incluyendo sobrenadantes de cultivos celulares industriales. Por consiguiente, en el mercado están disponibles diversas matrices que comprenden ligandos de proteína A, por ejemplo, en forma de la proteína A nativa (por ejemplo, Protein A SEPHAROSE™, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y también formados por proteína A recombinante (por ejemplo, rProtein A-SEPHAROSE™, GE Healthcare). De modo más específico, la manipulación  
30 genética realizada en el producto de proteína A recombinante del mercado se dirige a facilitar su unión a un soporte y a aumentar la productividad del ligando.

35 Estas aplicaciones, al igual que otras aplicaciones de cromatografía de afinidad, requieren una atención exhaustiva a la eliminación definitiva de contaminantes. Estos contaminantes pueden ser, por ejemplo, molécula no eluidas adsorbidas sobre la fase estacionaria o matriz en un procedimiento cromatográfico, tales como biomoléculas o microorganismos no deseados que incluyen, por ejemplo, proteínas, carbohidratos, lípidos, bacterias y virus. La eliminación de dichos contaminantes de la matriz se realiza habitualmente después de una primera elución del producto deseado para regenerar la matriz antes de un uso posterior. Esta eliminación habitualmente implica un procedimiento conocido como limpieza en el sitio ("cleaning-in-place", CIP), en el que se emplean agentes capaces de eluir contaminantes de la fase estacionaria. Una de estas clases de agentes que se emplean a menudo son las disoluciones alcalinas que se hacen  
40 pasar sobre dicha fase estacionaria. En la actualidad, el agente de limpieza y desinfección más empleado es NaOH, y su concentración puede variar de 0,1 hasta, por ejemplo, 1 M, dependiendo del grado y la naturaleza de la contaminación. Esta estrategia está asociada con la exposición de la matriz a disoluciones con unos valores de pH mayores que 13. Para muchas matrices de cromatografía de afinidad que contienen ligandos de afinidad proteicos, este entorno alcalino es una condición muy rigurosa y, en consecuencia, provoca una disminución en las capacidades debido  
45 a la inestabilidad del ligando en el pH alto implicado.

50 Por tanto, ciertas investigaciones exhaustivas se han centrado en el desarrollo de ligandos de proteínas modificados que muestren una mayor capacidad para soportar valores de pH alcalino. Por ejemplo, Gülich *et al.* (Susanne Gülich, Martin Linhult, Per-Åke Nygren, Mathias Uhlén, Sophia Hober, Journal of Biotechnology, 80 (2000), 169-178) sugieren la modificación de proteínas para mejorar las propiedades de estabilidad de un dominio de unión a albúmina (ABD) estreptocócica en entornos alcalinos. Gülich *et al.* crearon un mutante de ABD, en el que los cuatro restos asparagina se reemplazan por leucina (un resto), aspartato (dos restos) y lisina (un resto). Además, Gülich *et al.* indicaron que su mutante muestra un comportamiento de unión a la proteína diana similar al de la proteína nativa, y que las columnas de afinidad que contienen el ligando modificado muestran mayores capacidades de unión después de una exposición repetida a condiciones alcalinas que otras columnas preparadas usando el ligando no modificado originario. Por tanto,  
55 en ese documento se concluye que los cuatro restos asparagina pueden reemplazarse sin que se produzca ningún efecto significativo sobre la estructura y la función.

Un trabajo reciente demuestra que también pueden realizarse cambios en la proteína A (SpA) para conseguir propiedades similares. La publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2005/0143566 indica que, cuando al

menos un resto asparagina se muta en un aminoácido distinto de glutamina o ácido aspártico, la mutación confiere una mayor estabilidad química a valores de pH de hasta aproximadamente 13-14, en comparación con la SpA originaria, tal como el dominio de B de SpA, o proteína Z, una construcción sintética derivada del dominio B de SpA (documento US 5.143.844). Los autores demuestran que cuando se emplean estas proteínas mutadas como ligandos de afinidad, el medio de separación puede soportar mejor los procedimientos de limpieza que usan agentes alcalinos, tal como se esperaba. También se han publicado otras mutaciones de dominios de la proteína A con el fin de aumentar la estabilidad alcalina en los documentos US 8.329.860, JP 2006304633A, US 8.674.073, US 2010/0221844, US 2012/0208234, US 9.051.375, US 2014/0031522, US 2013/0274451 y WO 2014/146350. Sin embargo, los mutantes disponibles en la actualidad siguen siendo sensibles a un pH alcalino, y la concentración de NaOH durante la limpieza habitualmente se limita a 0,1 M, lo cual significa que una limpieza completa es difícil de lograr. Unas concentraciones más altas de NaOH, que podrían mejorar la limpieza, conducen a pérdidas de capacidad inaceptables. El documento WO 2015/005859 describe dominios de proteína A mutados con mayor estabilidad alcalina.

Por tanto, en este campo sigue siendo necesaria una matriz de separación que contenga ligandos de proteínas que tengan mayor estabilidad frente a procedimientos de limpieza alcalinos. También son necesarias dichas matrices con una mayor capacidad de unión para permitir una purificación económicamente eficaz de anticuerpos terapéuticos.

### Sumario de la invención

Un aspecto de la invención consiste en proporcionar una matriz de separación capaz de unir selectivamente inmunoglobulinas y otras proteínas que contienen Fc, y de mostrar una estabilidad alcalina mejorada. Esto se logra con una matriz de separación como se define en la reivindicación 1. La matriz comprende al menos 11 mg/ml de ligandos de unión a Fc unidos covalentemente a un soporte poroso, en la que:

- a) los ligandos comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis,
- b) el soporte poroso comprende partículas de polímeros reticulados que tienen una mediana ponderada por volumen del diámetro (d<sub>50,v</sub>) de 56-70 micrómetros, y un peso de sólidos secos de 55-80 mg/ml.

Una ventaja es que se proporciona una alta capacidad de unión dinámica. Otra ventaja es que se logra un alto grado de estabilidad alcalina.

Un segundo aspecto de la invención consiste en proporcionar un método eficaz y barato para aislar una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc. Esto se logra con un método como se define en la reivindicación 13, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una muestra líquida que comprende una inmunoglobulina con una matriz de separación como se describió anteriormente,
- b) lavar la matriz de separación con un líquido de lavado,
- c) eluir la inmunoglobulina de la matriz de separación con un líquido de elución, y
- d) limpiar la matriz de separación con un líquido de limpieza.

Se describen otras realizaciones adecuadas de la invención en las reivindicaciones dependientes.

### Definiciones

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en la presente e incluyen también fragmentos de anticuerpo, proteínas de fusión que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y conjugados que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

Las expresiones "polipéptido de unión a Fc" y "proteína de unión a Fc" significan un polipéptido o una proteína, respectivamente, capaz de unirse a la parte cristalizable (Fc) de un anticuerpo e incluyen, por ejemplo, proteína A y proteína G, o cualquiera de sus fragmentos o proteínas de fusión que mantengan dicha propiedad de unión.

El término "conector" en la presente significa un elemento que conecta dos unidades de polipéptido, monómeros o dominios entre sí para formar un multímero.

El término "espaciador" en la presente significa un elemento que conecta un polipéptido o un multímero de polipéptido a un soporte.

La expresión "porcentaje de identidad" con respecto a las comparaciones de secuencias de aminoácidos se determina mediante algoritmos de alineamiento convencionales, tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST™) descrito en Altschul *et al.* (1990), J. Mol. Biol., 215:403-410. Está libremente disponible un software con base en la red de US National Library of Medicine en [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). En este caso, se usa el algoritmo "blastp (protein-protein BLAST)" para el

alineamiento de una secuencia interrogante con una secuencia sujeto y determinar, concretamente, el porcentaje de identidad.

5 Tal como se emplean en la presente, los términos "comprende", "comprendiendo", "contiene", "teniendo" y similares tienen el significado atribuido a ellos en la ley de patentes de EE. UU. y pueden significar "incluye", "incluyendo" y similares; de modo similar, las expresiones "consiste fundamentalmente en" o "consiste fundamentalmente" tienen el significado atribuido a ellas en la ley de patentes de EE. UU. y las expresiones no tienen un límite fijo, permitiendo la presencia de más de lo que se indica, con la condición de que las características básicas o nuevas de lo que se indica no cambien por la presencia de más de lo que se indica, pero excluyen las realizaciones de la técnica anterior.

### Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 muestra un alineamiento de los dominios de unión a Fc, según se definen mediante SEQ ID NO:1-7 y 51-52.

La figura 2 muestra los resultados del ejemplo 2 para la estabilidad alcalina de variantes del polipéptido Zvar tetramérico originario y mutado (SEQ ID NO:7) acoplados a un chip biodetector SPR.

La figura 3 muestra los resultados del ejemplo 4 para la estabilidad alcalina (NaOH 0,5 M) de variantes del polipéptido Zvar tetramérico originario y mutado (SEQ ID NO:7) acoplados a esferas de agarosa.

15 La figura 4 muestra los resultados del ejemplo 4 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de variantes del polipéptido Zvar tetramérico originario y mutado (SEQ ID NO:7) acoplados a esferas de agarosa.

20 La figura 5 muestra los resultados del ejemplo 7 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de esferas de agarosa con diferentes cantidades de variantes de multímeros mutados (SEQ ID NO:20) acoplados. Los resultados se representan gráficamente como la capacidad dinámica remanente relativa (Qb10 %, 6 min de tiempo de residencia) frente al tiempo de incubación en NaOH 1 M.

La figura 6 muestra los resultados del ejemplo 7 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de esferas de agarosa con diferentes cantidades de variantes de multímeros mutados (SEQ ID NO:20) acoplados. Los resultados se representan gráficamente como la capacidad dinámica remanente relativa (Qb10 %, 6 min de tiempo de residencia) después de 31 h de incubación en NaOH 1 M frente al contenido en ligando de los prototipos.

### 25 Descripción detallada de las realizaciones

Los ligandos de unión a Fc en la matriz de la invención pueden comprender un polipéptido de unión a Fc que comprende, o que consiste fundamentalmente en un mutante de un dominio de unión a Fc de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA), definido por, o que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad con SEQ ID NO:1 (dominio E), SEQ ID NO:2 (dominio D), SEQ ID NO:3 (dominio A), SEQ ID NO:22 (variante del dominio A), SEQ ID NO:4 (dominio B), SEQ ID NO:5 (dominio C), SEQ ID NO:6 (proteína Z), SEQ ID NO:7 (Zvar), SEQ ID NO:51 (Zvar sin los aminoácidos de la región de conector 1-8 y 56-58) o SEQ ID NO:52 (dominio C sin los aminoácidos de la región de conector 1-8 y 56-58), tal como se ilustra en la figura 1, en el que al menos el resto asparagina (o serina, en el caso de SEQ ID NO:2) en la posición\* correspondiente a la posición 11 en SEQ ID NO:4-7 ha sido mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina. La proteína Z (SEQ ID NO:6) es un dominio B mutado de la proteína Z, denominado en la presente Zvar, con las mutaciones N3A,N6D,N23T. SEQ ID NO:22 es un variante natural del dominio A de la proteína A de la cepa de *Staphylococcus aureus* N315 que tiene una mutación A46S, usando la terminología de posición de la figura 1. La mutación de N11 en estos dominios confiere una mayor estabilidad alcalina en comparación con el dominio/polipéptido originario, sin alterar las propiedades de unión a inmunoglobulinas. Por tanto, el polipéptido también puede describirse como un polipéptido de unión a Fc o a inmunoglobulina o, como alternativa, como una unidad de polipéptido de unión a Fc o a inmunoglobulina.

45 \*A través de esta descripción se usa la convención de numeración de las posiciones de los restos aminoácidos de la figura 1, y los números de las posiciones se designan según los correspondientes en SEQ ID NO:4-7. Esto también se aplica a multímeros, en los que los números de las posiciones designan las posiciones en las unidades de polipéptido o monómeros según la convención de la figura 1.

SEQ ID NO:51 (Zvar truncada)

QQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQ

SEQ ID NO:52 (dominio C truncado)

50 QQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LNDAQ

En una formulación alternativa, los ligandos de unión a Fc pueden comprender un polipéptido de unión a Fc que comprende una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad con SEQ ID NO:53.

SEQ ID NO 53

X<sub>1</sub>Q X<sub>2</sub>AFYEILX<sub>3</sub>LP NLTEEQRX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>F IX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>LKDX<sub>8</sub>PSX<sub>9</sub>

SX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>LAEAKX<sub>13</sub> X<sub>14</sub>NX<sub>15</sub>AQ

en la que, individualmente entre sí:

X<sub>1</sub> = A, Q o está delecionado

X<sub>2</sub> = E, K, Y, T, F, L, W, I, M, V, A, H o R

5 X<sub>3</sub> = H o K

X<sub>4</sub> = A o N

X<sub>5</sub> = A, G, S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K, tal como S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K

X<sub>6</sub> = Q o E

X<sub>7</sub> = S o K

10 X<sub>8</sub> = E o D

X<sub>9</sub> = Q, V o está delecionado

X<sub>10</sub> = K, R, A o está delecionado

X<sub>11</sub> = A, E, N o está delecionado

X<sub>12</sub> = I o L

15 X<sub>13</sub> = K o R

X<sub>14</sub> = L o Y

X<sub>15</sub> = D, F, Y, W, K o R

Específicamente, los restos aminoácidos en SEQ ID NO:53 pueden ser, individualmente entre sí:

X<sub>1</sub> = A o está delecionado

20 X<sub>2</sub> = E

X<sub>3</sub> = H

X<sub>4</sub> = N

X<sub>6</sub> = Q

X<sub>7</sub> = S

25 X<sub>8</sub> = D

X<sub>9</sub> = V o está delecionado

X<sub>10</sub> = K o está delecionado

X<sub>11</sub> = A o está delecionado

X<sub>12</sub> = I

30 X<sub>13</sub> = K

X<sub>14</sub> = L.

En ciertas realizaciones, los restos aminoácidos en SEQ ID NO:53 pueden ser: X<sub>1</sub> = A, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V, X<sub>10</sub> = K, X<sub>11</sub> = A, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L. En algunas realizaciones, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>5</sub> = A, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L y X<sub>15</sub> = D, y uno o más de X<sub>1</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub> y X<sub>11</sub> están delecionados. En otras realizaciones, X<sub>1</sub> = A, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>5</sub> = S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V, X<sub>10</sub> = K, X<sub>11</sub> = A, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L y X<sub>15</sub> = D, o, como alternativa, X<sub>1</sub> = A, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>5</sub> = A, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V, X<sub>10</sub> = K, X<sub>11</sub> = A, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L y X<sub>15</sub> = F, Y, W, K o R.

35

- La mutación N11 (X<sub>2</sub>) (por ejemplo, una mutación N11E o N11K) puede ser la única mutación o el polipéptido también puede comprender otras mutaciones, tales como sustituciones en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 3, 6, 9, 10, 15, 18, 23, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 42, 43, 44, 47, 50, 51, 55 y 57 en SEQ ID NO:4-7. En una o más de estas posiciones, el resto aminoácido original, por ejemplo, puede estar sustituido por un aminoácido que no es asparagina, prolina o cisteína. El resto aminoácido original, por ejemplo, puede estar sustituido por una alanina, una valina, una treonina, una serina, una lisina, un ácido glutámico o un ácido aspártico. Además, uno o más restos aminoácidos pueden estar delecionados, por ejemplo, de las posiciones 1-6 y/o de las posiciones 56-58.
- 5 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 9 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>1</sub>) es un aminoácido distinto de glutamina, asparagina, prolina o cisteína, tal como una alanina, o puede estar delecionado. La combinación de las mutaciones en las posiciones 9 y 11 proporciona una estabilidad alcalina particularmente buena, tal como se muestra en los ejemplos. En realizaciones específicas, en SEQ ID NO:7, el resto aminoácido en la posición 9 es una alanina, y el resto aminoácido en la posición 11 es una lisina o un ácido glutámico, tal como una lisina. Las mutaciones en la posición 9 también se analizan en la solicitud en tramitación junto con la presente PCT/SE2014/050872.
- 10 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 50 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>13</sub>) es una arginina o un ácido glutámico.
- 15 En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 3 en SEQ ID NO:4-7 es una alanina y/o el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 6 en SEQ ID NO:4-7 es un ácido aspártico. Uno de los restos aminoácidos en las posiciones 3 y 6 puede ser una asparagina y, en una realización alternativa, ambos restos aminoácidos en las posiciones 3 y 6 pueden ser asparaginas.
- 20 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 43 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>11</sub>) es una alanina o un ácido glutámico, tal como una alanina, o puede estar delecionado. En realizaciones específicas, los restos aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO:7 son alanina y lisina/ácido glutámico, respectivamente, mientras que el resto aminoácido en la posición 43 es alanina o ácido glutámico.
- 25 En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 28 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>5</sub>) es una alanina o una asparagina, tal como una alanina.
- 30 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 40 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>9</sub>) se selecciona del grupo que consiste en asparagina, alanina, ácido glutámico y valina, o del grupo que consiste en ácido glutámico y valina, o puede estar delecionado. En realizaciones específicas, los restos aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO:7 son alanina y ácido glutámico, respectivamente, mientras que el resto aminoácido en la posición 40 es valina. Opcionalmente, entonces el resto aminoácido en la posición 43 puede ser alanina o ácido glutámico.
- 35 En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 42 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>10</sub>) es una alanina, una lisina o una arginina, o puede estar delecionado.
- En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 18 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>3</sub>) es una lisina o una histidina, tal como una lisina.
- En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 33 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>7</sub>) es una lisina o una serina, tal como una lisina.
- En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 37 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>8</sub>) es un ácido glutámico o un ácido aspártico, tal como un ácido glutámico.
- 40 En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>14</sub>) es una tirosina o una leucina, tal como una tirosina.
- 45 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 44 en SEQ ID NO:4-7 (X<sub>12</sub>) es una leucina o una isoleucina. En realizaciones específicas, los restos aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO:7 son alanina y lisina/ácido glutámico, respectivamente, mientras que el resto aminoácido en la posición 44 es isoleucina. Opcionalmente, entonces el resto aminoácido en la posición 43 puede ser alanina o ácido glutámico.
- En algunas realizaciones, los restos aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 1, 2, 3 y 4, o a las posiciones 3, 4, 5 y 6 en SEQ ID NO:4-7 han sido delecionados. En variantes específicos de estas realizaciones, el polipéptido originario es el dominio C de la proteína A (SEQ ID NO:5). Los efectos de estas deleciones sobre el dominio C nativo se describen en los documentos US9018305 y US8329860.
- 50 En ciertas realizaciones, la mutación en SEQ ID NO:4-7, tal como en SEQ ID NO:7, se selecciona del grupo que consiste en: N11K; N11E; N11Y; N11T; N11F; N11L; N11W; N11I; N11M; N11V; N11A; N11H; N11R; N11E,Q32A; N11E,Q32E,Q40E; N11E,Q32E,K50R; Q9A,N11E,N43A; Q9A,N11E,N28A,N43A; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I; N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I; Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; N11K, H18K,

- D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R; Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R; Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I y Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I. Estas mutaciones proporcionan estabilidades alcalinas particularmente altas. La mutación en SEQ ID NO:4-7, tal como en SEQ ID NO:7, también puede seleccionarse del grupo que consiste en N11K; N11Y; N11F; N11L; N11W; N11I; N11M; N11V; N11A; N11H; N11R; Q9A,N11E,N43A; Q9A,N11E,N28A,N43A; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I; Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I; N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I y Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R.
- 5
- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido comprende o consiste fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 y SEQ ID NO:50. Por ejemplo, puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29. También puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:41; SEQ ID NO:42; SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48.
- 15
- 20
- 25 En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende o consiste fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:54-70, comprende o consiste fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:71-75, o puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:76-79. También puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:89-95.
- 30
- 35 Por ejemplo, el polipéptido puede definirse mediante una secuencia seleccionada de los anteriores grupos o de subconjuntos de estos grupos, pero también puede comprender restos aminoácidos adicionales en el extremo N- y/o C-terminal, por ejemplo, una secuencia conductora en el extremo N-terminal y/o una secuencia de cola en el extremo C-terminal.
- SEQ ID NO 8 Zvar(Q9A,N11E,N43A)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK  
LNDAQAPK
- SEQ ID NO 9 Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK  
LNDAQAPK
- SEQ ID NO 10 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK  
40 LNDAQAPK
- SEQ ID NO 11 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK
- SEQ ID NO 12 Zvar(N11E,Q32A)  
VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IASLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK
- SEQ ID NO 13 Zvar(N11E)  
VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 14 Zvar(N11E,Q32E,Q40E)

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSE SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 15 Zvar(N11E,Q32E,K50R)

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSQ SANLLAEAKR  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 16 Zvar(N11K)

VDAKFDKEQQ KAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 23 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SRAILAEAKR  
YNDAQAPK

SEQ ID NO 24 Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)

5 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 25 Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRAAF IQCLKDEPSQ SRAILAEAKR  
YNDAQAPK

SEQ ID NO 26 Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 27 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 28 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKR  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 29 Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)

10 VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 36 B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)

ADNKFNKEAQ EAFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 37 C(Q9A,N11E,E43A)

ADNKFNKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 38 Zvar(N11Y)

VDAKFDKEQQ YAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 39 Zvar(N11T)

VDAKFDKEQQ TAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 40 Zvar(N11F)

15 VDAKFDKEQQ FAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 41 Zvar(N11L)  
VDAKFDKEQQ LAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 42 Zvar(N11W)

VDAKFDKEQQ WAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 43 Zvar(N11I)

VDAKFDKEQQ IAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 44 Zvar(N11M)

5 VDAKFDKEQQ MAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 45 Zvar(N11V)

VDAKFDKEQQ VAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 46 Zvar(N11A)

VDAKFDKEQQ AAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 47 Zvar(N11H)

VDAKFDKEQQ HAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 48 Zvar(N11R)

VDAKFDKEQQ RAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 49 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)

10 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 50 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 54 Zvar(Q9A,N11E, A29G,Q40V,A42K,N43A,L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 55 Zvar(Q9A,N11E, A29S,Q40V,A42K,N43A,L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNSF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 56 Zvar(Q9A,N11E, A29Y,Q40V,A42K,N43A,L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNYF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 57 Zvar(Q9A,N11E, A29Q,Q40V,A42K,N43A,L44I)

15 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNQF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 58 Zvar(Q9A,N11E, A29T,Q40V,A42K,N43A,L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNTF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 59 Zvar(Q9A,N11E, A29N,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNMF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 60 Zvar(Q9A,N11E, A29F,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNFF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 61 Zvar(Q9A,N11E, A29L,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNLF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 62 Zvar(Q9A,N11E, A29W,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNWF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

5 SEQ ID NO 63 Zvar(Q9A,N11E, A29I,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNIF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 64 Zvar(Q9A,N11E, A29M,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNMF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 65 Zvar(Q9A,N11E, A29V,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNVF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 66 Zvar(Q9A,N11E, A29D,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNDF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 67 Zvar(Q9A,N11E, A29E,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNEF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

10 SEQ ID NO 68 Zvar(Q9A,N11E, A29H,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNHF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 69 Zvar(Q9A,N11E, A29R,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNRF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 70 Zvar(Q9A,N11E, A29K,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNKF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK

SEQ ID NO 71 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53F)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNFAQAPK

SEQ ID NO 72 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53Y)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNYAQAPK

15 SEQ ID NO 73 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53W)  
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNWAQAPK

SEQ ID NO 74 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53K)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNKAQAPK

SEQ ID NO 75 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53R)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNRAQAPK

SEQ ID NO 76 Zvar(Q9del,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I)  
 VDAKFDKE\_Q EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK

SEQ ID NO 77 Zvar(Q9A,N11E, Q40del,A42K,N43A,L44I)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK

5 SEQ ID NO 78 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42del,N43A,L44I)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV S\_AILAEAKK  
 LNDAQAPK

SEQ ID NO 79 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43del,L44I)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SK\_ILAEAKK  
 LNDAQAPK

SEQ ID NO 89 Zvar(D2del,A3del,K4del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
 V\_\_FDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK

SEQ ID NO 90 Zvar(V1del,D2del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,K58del)  
 \_\_AKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAP\_\_

SEQ ID NO 91 Zvar(K4del,F5del,D6del,K7del,E8del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
 VDA\_\_\_\_AQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK

10 SEQ ID NO 92 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,A56del,P57del,K58del)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQ\_\_\_\_

SEQ ID NO 93 Zvar(V1del,,D2del,A3del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
 \_\_\_\_KFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK

SEQ ID NO 94  
 Zvar(V1del,D2del,A3del,K4del,F5del,D6del,K7del,E8del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)  
 \_\_\_\_\_AQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK

SEQ ID NO 95 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,K58\_insYEDG)  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPKYE DG

15 Los ligandos de unión a Fc pueden ser multímeros que comprenden o que consisten fundamentalmente en una pluralidad de unidades de polipéptidos, según se define en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. El uso de multímeros puede aumentar la capacidad de unión a inmunoglobulinas, y los multímeros también pueden tener

- una estabilidad alcalina mayor que los monómeros. El multímero puede ser, por ejemplo, un dímero, un trímero, un tetramero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero o un nonámero. Puede ser un homomultímero, en el que todas las unidades del multímero son idénticas, o puede ser un heteromultímero, en el que al menos una unidad se diferencia de las otras. De modo ventajoso, todas las unidades en el multímero son estables en álcalis, tal como por comprender las mutaciones descritas anteriormente. Los polipéptidos pueden estar conectados entre sí directamente mediante enlaces peptídicos entre los extremos C-terminal y N-terminal de los polipéptidos. Como alternativa, dos o más unidades en el multímero pueden estar conectadas por conectores que comprenden especies oligoméricas o poliméricas, tales como conectores que comprenden péptidos de hasta 25 o 30 aminoácidos, tal como 3-25 o 3-20 aminoácidos. Los conectores, por ejemplo, pueden comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia peptídica definida por, o que tiene al menos 90 % de identidad o al menos 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en APKVDAKFDKE, APKVDNKFNKE, APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APK, APKYEDGVDAKFDKE y YEDG o, como alternativa, seleccionada del grupo que consiste en APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APKYEDGVDAKFDKE y YEDG. También pueden consistir fundamentalmente en una secuencia peptídica definida por, o que tiene al menos 90 % de identidad o al menos 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APK y APKYEDGVDAKFDKE. En algunas realizaciones, los conectores no consisten en los péptidos APKVDAKFDKE o APKVDNKFNKE, o, como alternativa, no consisten en los péptidos APKVDAKFDKE, APKVDNKFNKE, APKFNKE, APKFDKE, APKVDKE o APKADKE.
- La naturaleza de dicho conector preferiblemente no debe desestabilizar la conformación espacial de las unidades de proteína. Esto puede lograrse, por ejemplo, evitando la presencia de prolina en los conectores. Además, dicho conector preferiblemente debe ser lo suficientemente estable en entornos alcalinos como para no alterar las propiedades de las unidades de proteína mutadas. Para este fin, resulta ventajoso que los conectores no contengan asparagina. También puede ser ventajoso que los conectores no contengan glutamina. El multímero puede comprender también, en el extremo N-terminal, una pluralidad de restos aminoácidos, por ejemplo, que se originan del proceso de clonación o que constituyen un residuo de una secuencia de señalización escindida. El número de restos aminoácidos adicionales puede ser, por ejemplo, de 20 o menor, tal como 15 o menor, tal como 10 o menor, o 5 o menor. Como ejemplo específico, el multímero puede comprender una secuencia AQ, AQGT, VDAKFDKE, AQVDAKFDKE o AQGTVDAKFDKE en el extremo N-terminal.
- En ciertas realizaciones, el multímero puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:80-87. Estas y otras secuencias adicionales se listan a continuación y se denominan como Originaria(Mutaciones)<sub>n</sub>, en las que n es el número de unidades de monómero en un multímero.
- SEQ ID NO 17 Zvar(Q9A,N11E,N43A)<sub>4</sub>  
 AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ  
 SAALLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDAQAPKC
- SEQ ID NO 18 Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)<sub>4</sub>  
 AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ  
 SAALLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF  
 IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDAQAPKC
- SEQ ID NO 19 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)<sub>4</sub>  
 AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV  
 SKEILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LNDAQAPKC
- SEQ ID NO 20 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)<sub>4</sub>  
 AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV  
 SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPKC

SEQ ID NO 30 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4  
 AAGT VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SRILAEAKR  
 YNDAQAPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ  
 SRILAEAKR YNDAQAPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF  
 IQCLKDEPSQ SRILAEAKR YNDAQAPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP  
 NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SRILAEAKR YNDAQAPKC

SEQ ID NO 31 Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)4  
 AAGT VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ  
 SRNLLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK LNDAQAPKC

SEQ ID NO 32 Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)4  
 AAGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV  
 SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF  
 IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPKC

SEQ ID NO 33 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6  
 AAGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV  
 SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ  
 EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQAPK  
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPKC

SEQ ID NO 34 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4  
 AAGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV  
 SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDEPSV SKAILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK LNDAQAPKC

5

SEQ ID NO 35 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)4  
 AAGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRILAEAKK  
 LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV  
 SRILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF  
 IQSLKDEPSV SRILAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP  
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRILAEAKK LNDAQAPKC

SEQ ID NO 80 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con D2, A3 y K4  
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK **VFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 81 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K58, V1 y D2  
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAP **AKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 82 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con P57, K58, V1, D2 y A3  
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAP **AKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 83 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K4, F5, D6, K7 y E8  
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK **VDAAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 84 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con A56, P57 y K58  
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDAQ  
**VDAKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 85 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2 y A3  
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK **KFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 86 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2, A3, K4, F5, D6, K7  
y E8 en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK **AQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPKC

SEQ ID NO 87 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con YEDG insertado en el conector  
entre K58 y V1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK **YEDG VDAKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV  
SKAILAEAKK LNDAQAPKC

SEQ ID NO 88 Zvar2

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK  
LNDAQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV  
SKAILAEAKK LNDAQAPKC

En algunas realizaciones, el polipéptido y/o multímero, tal como se describió anteriormente, comprende, además, en el extremo C-terminal o N-terminal, uno o más elementos de acoplamiento, seleccionados del grupo que consiste en uno o

más restos cisteína, una pluralidad de restos lisina y una pluralidad de restos histidina. El elemento o elementos de acoplamiento también pueden estar emplazados dentro de 1-5 restos aminoácidos, tal como dentro de 1-3 o 1-2 restos aminoácidos desde el extremo C-terminal o N-terminal. El elemento de acoplamiento puede ser, por ejemplo, una única cisteína en el extremo C-terminal. El elemento o elementos de acoplamiento pueden conectarse directamente al extremo C- o N-terminal o pueden conectarse a través de un tramo que comprende hasta 15 aminoácidos, tal como 1-5, 1-10 o 5-10 aminoácidos. Este tramo preferiblemente debe ser lo suficientemente estable en entornos alcalinos como para no alterar las propiedades de la proteína mutada. Para este fin, resulta ventajoso que el tramo no contenga asparagina. También puede ser ventajoso que el tramo no contenga glutamina. Una ventaja de contar con una cisteína C-terminal es que puede lograrse el acoplamiento final de la proteína a través de la reacción del tiol de la cisteína con un grupo electrófilo sobre un soporte. Esto proporciona una excelente movilidad de la proteína acoplada, lo cual es importante para la capacidad de unión.

La estabilidad alcalina del polipéptido o multímero puede evaluarse acoplándolo a un chip SPR, por ejemplo, a los chips detectores Biacore CM5 como se describe en los ejemplos, usando, por ejemplo, la química de acoplamiento de NHS o maleimida, y midiendo la capacidad de unión a inmunoglobulinas del chip, generalmente usando una IgG humana policlonal, antes y después de una incubación en disoluciones alcalinas a una temperatura especificada, por ejemplo, 22 +/- 2 °C. La incubación puede realizarse, por ejemplo, en NaOH 0,5 M durante una serie de ciclos de 10 min, tal como 100, 200 o 300 ciclos. La capacidad de la IgG de la matriz después de 100 ciclos de incubación de 10 min en NaOH 0,5 M a 22 +/- 2 °C puede ser al menos 55, tal como al menos 60, al menos 80 o al menos 90 % de la capacidad de la IgG antes de la incubación. Como alternativa, la capacidad de la IgG remanente después de 100 ciclos para un mutante concreto medida como se indicó anteriormente puede compararse con la capacidad de IgG remanente para el polipéptido/multímero originario. En este caso, la capacidad de la IgG remanente para el mutante puede ser al menos 105 %, tal como al menos 110 %, al menos 125 %, al menos 150 % o al menos 200 % del polipéptido/multímero originario.

La presente invención describe una matriz de separación, en la que una pluralidad de multímeros según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente han sido acoplados a un soporte sólido. La matriz de separación comprende al menos 11, tal como 11-21, 15-21 o 15-18 mg/ml de ligandos de unión a Fc unidos covalentemente a un soporte poroso, en la que:

- a) los ligandos comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis,
- b) el soporte poroso comprende partículas de polímeros reticulados que tienen una mediana ponderada por volumen del diámetro (d<sub>50,v</sub>) de 56-70, tal como 56-66 micrómetros, y un peso de sólidos secos de 55-80, tal como 60-78 o 65-78 mg/ml. Las partículas de polímeros reticulados tienen un tamaño de poro correspondiente a un valor de Kd de cromatografía de filtración en gel inversa de 0,69-0,85, tal como 0,70-0,85 o 0,69-0,80, para dextrano de Pm 110 kDa. De modo adecuado, las partículas de polímeros reticulados pueden tener una elevada rigidez para ser capaces de soportar unos caudales elevados. La rigidez puede medirse con un ensayo de flujo-presión, tal como se describe más a fondo en el ejemplo 8, en el que una columna cargada con la matriz se somete a caudales crecientes de agua destilada. La presión se aumenta en etapas y se mide el caudal y la contrapresión hasta que el caudal comienza a disminuir con presiones crecientes. Se miden el caudal máximo logrado y la presión máxima (la contrapresión correspondiente al caudal máximo) y se emplean como mediciones de la rigidez. Cuando se mide en una columna FineLine™ 35 (GE Healthcare Life Sciences) a una altura de lecho de 300 +/- 10 mm, la presión máxima puede ser, de modo adecuado, al menos 0,58 MPa, tal como al menos 0,60 MPa. Esto permite el uso de diámetros de partícula más pequeños, lo cual es beneficioso para la capacidad dinámica. Los multímeros pueden comprender, por ejemplo, tetrámeros, pentámeros, hexámeros o heptámeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis, tales como hexámeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis. La combinación de un alto contenido en ligando con un intervalo de tamaño de partícula, el intervalo de peso de sólidos secos y el intervalo de Kd opcional proporciona una alta capacidad de unión, por ejemplo, de modo que la capacidad de unión dinámica de remoción al 10 % para la IgG sea de al menos 45 mg/ml, tal como al menos 50 o al menos 55 mg/ml a 2,4 min de tiempo de residencia. Como alternativa, o además, la capacidad de unión dinámica de remoción al 10 % para la IgG puede ser al menos 60 mg/ml, tal como al menos 65, al menos 70 o al menos 75 mg/ml a 6 min de tiempo de residencia.

Los multímeros de proteína A estabilizados frente a álcalis son muy selectivos para la IgG, y la matriz de separación puede tener, de forma adecuada, una constante de disociación para la IgG2 humana menor que 0,2 mg/ml, tal como menor que 0,1 mg/ml, en tampón fosfato 20 mM, NaCl 180 mM, pH 7,5. Esto puede determinarse según el método de isoterma de adsorción descrito en N. Pakiman *et al.*, J. Appl. Sci., 12, 1136-1141 (2012).

En ciertas realizaciones, los dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis comprenden mutantes de un dominio de unión a Fc originario de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA), definidos por, o que tienen al menos 80 % tal como al menos 90 %, 95 % o 98 % de identidad con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:51 o SEQ ID NO:52, en los que al menos el resto asparagina o serina en la posición correspondiente a la posición 11 en SEQ ID NO:4-7 ha sido mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina, tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico y lisina. El resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 40 en SEQ ID NO:4-7 puede ser valina o puede haber sido mutado a una valina. Los dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis

también pueden comprender cualquier mutación como se describe en las realizaciones anteriores del polipéptido y/o multímero.

En algunas realizaciones, los dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis comprenden un polipéptido de unión a Fc que tiene una secuencia de aminoácidos definida por, o que tiene al menos 80 %, o al menos 90, 95 % o 98 % de identidad con SEQ ID NO:53,

X<sub>1</sub>Q X<sub>2</sub>AFYEILX<sub>3</sub>LP NLTEEQRX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>F IX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>LKDX<sub>8</sub>PSX<sub>9</sub> SX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>LAEAKX<sub>13</sub>  
X<sub>14</sub>NX<sub>15</sub>AQ (SEQ ID NO 53)

en la que, individualmente entre sí:

X<sub>1</sub> = A o Q o está delecionado

X<sub>2</sub> = E, K, Y, T, F, L, W, I, M, V, A, H o R

10 X<sub>3</sub> = H o K

X<sub>4</sub> = A o N

X<sub>5</sub> = A, G, S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K

X<sub>6</sub> = Q o E

X<sub>7</sub> = S o K

15 X<sub>8</sub> = E o D

X<sub>9</sub> = Q o V o está delecionado

X<sub>10</sub> = K, R o A o está delecionado

X<sub>11</sub> = A, E o N o está delecionado

X<sub>12</sub> = I o L

20 X<sub>13</sub> = K o R

X<sub>14</sub> = L o Y

X<sub>15</sub> = D, F, Y, W, K o R

En algunas realizaciones, los restos aminoácidos pueden ser, individualmente entre sí:

25 a) X<sub>1</sub> = A o está delecionado, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V o está delecionado, X<sub>10</sub> = K o está delecionado, X<sub>11</sub> = A o está delecionado, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L.

b) X<sub>1</sub> = A, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>5</sub> = A, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V, X<sub>10</sub> = K, X<sub>11</sub> = A, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L y X<sub>15</sub> = D.

c) X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V, X<sub>10</sub> = K, X<sub>11</sub> = A, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L y X<sub>15</sub> = D o

d) X<sub>1</sub> es A, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>5</sub> = A, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V, X<sub>10</sub> = K, X<sub>11</sub> = A, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L y X<sub>15</sub> = D.

30 En ciertas realizaciones, la invención describe una matriz de separación que comprende al menos 15, tal como 15-21 o 15-18 mg/ml de ligandos de unión a Fc unidos covalentemente a un soporte poroso, en la que los ligandos comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis. Estos multímeros pueden ser, de modo adecuado, como se describen en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente o como se especifica a continuación.

35 Dicha matriz es útil para la separación de inmunoglobulinas u otras proteínas que contienen Fc y, debido a la mayor estabilidad alcalina de los polipéptidos/multímeros, la matriz aguantará condiciones muy alcalinas durante la limpieza, lo cual resulta fundamental para un uso repetido a largo plazo en un entorno de separación de un bioproceso. La estabilidad alcalina de la matriz puede evaluarse midiendo la capacidad de unión a inmunoglobulinas, generalmente usando una IgG humana policlonal, antes y después de una incubación en disoluciones alcalinas a una temperatura especificada, por ejemplo, 22 +/- 2 °C. La incubación puede realizarse, por ejemplo, en NaOH 0,5 M o 1,0 M durante un número de ciclos de 15 min, tales como 100, 200 o 300 ciclos, que corresponden con un tiempo total de incubación de 40 25, 50 o 75 h. La capacidad de la IgG de la matriz después de 96-100 ciclos de incubación de 15 min o un tiempo total de incubación de 24 o 25 h en NaOH 0,5 M a 22 +/- 2 °C puede ser al menos 80, tal como al menos 85, al menos 90 o al menos 95 % de la capacidad de la IgG antes de la incubación. La capacidad de la matriz después de un tiempo total de incubación de 24 h en NaOH 1,0 M a 22 +/- 2 °C puede ser al menos 70, tal como al menos 80 o al menos 90 % de la capacidad de la IgG antes de la incubación. La capacidad de unión dinámica de remoción al 10 % (Qb10 %) para la

IgG a 2,4 min o 6 min de tiempo de residencia puede reducirse, por ejemplo, en menos del 20 % después de una incubación durante 31 h en NaOH acuoso 1,0 M a 22 +/- 2 C.

5 Como entenderán los expertos en la técnica, el polipéptido o multímero expresado debe purificarse hasta un grado apropiado antes de ser inmovilizado sobre un soporte. Estos métodos de purificación son muy conocidos en la técnica, y la inmovilización de ligandos basados en proteínas a soportes se realiza con facilidad usando métodos convencionales. A continuación, se analizarán con más detalle los métodos y soportes adecuados.

10 A menudo, una matriz de separación por afinidad convencional tiene naturaleza orgánica y se basa en polímeros que exponen una superficie hidrófila al medio acuoso usado, es decir, exponen grupos hidroxilo (-OH), carboxi (-COOH), carboxamido (-CONH<sub>2</sub>, según cabe suponer en formas N-sustituidas), amino (-NH<sub>2</sub>, según cabe suponer en forma  
15 sustituida), oligo- o polietilenoxi sobre su superficie externa y, si están presentes, también sobre las superficies internas. El soporte sólido es poroso. La porosidad puede expresarse como un valor de Kav o Kd (la fracción del volumen de poro disponible para una molécula de sonda de un tamaño concreto) medido mediante una cromatografía de exclusión molecular inversa, por ejemplo, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB  
20 Biotechnology, 1991, pp. 6-13. Kav se determina como la proporción  $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ , en la que  $V_e$  es el volumen de elución de una molécula de sonda (por ejemplo, dextrano 110 kD),  $V_0$  es el volumen de vacío de la columna (por ejemplo, el volumen de elución de un marcador de vacío de alto Pm, tal como dextrano bruto), y  $V_t$  es el volumen total de la columna. Kd puede determinarse como  $(V_e - V_0)/V_i$ , en la que  $V_i$  es el volumen de elución de una sal (por ejemplo, NaCl) capaz de acceder a todo el volumen excepto al volumen de la matriz (el volumen ocupado por las moléculas poliméricas de la matriz). Por definición, los valores de Kd y Kav siempre se encuentran dentro del intervalo de 0-1. El  
25 valor de Kav puede ser, de forma ventajosa, 0,6-0,95, por ejemplo, 0,7-0,90 o 0,6-0,8, medido con dextrano de Pm 110 kDa como molécula de sonda. El valor de Kd medido con dextrano de Pm 110 kDa puede ser, de modo adecuado, 0,68-0,90, tal como 0,68-0,85 o 0,70-0,85. Una ventaja de esto es que el soporte tiene una gran fracción de poros capaces de alojar los polipéptidos/multímeros de la invención y las inmunoglobulinas que se unen a los polipéptidos/multímeros, y de proporcionar un transporte en masa de las inmunoglobulinas hacia los sitios de unión y desde los sitios de unión.

25 Los polipéptidos o multímeros pueden unirse al soporte a través de técnicas de acoplamiento convencionales usando, por ejemplo, grupos tiol, amino y/o carboxi presentes en el ligando. Los bisepóxidos, la epíclorohidrina, CNBr, la N-hidroxisuccinimida (NHS) etc., son reactivos de acoplamiento muy conocidos. Entre el soporte y el polipéptido/multímero puede introducirse una molécula conocida como espaciador, que mejora la disponibilidad del polipéptido/multímero y facilita el acoplamiento químico del polipéptido/multímero con el soporte. Dependiendo de la naturaleza del  
30 polipéptido/multímero y de las condiciones de acoplamiento, el acoplamiento puede ser un acoplamiento de múltiples puntos (por ejemplo, a través de una pluralidad de lisinas) o un acoplamiento de un solo punto (por ejemplo, a través de una única cisteína). Como alternativa, el polipéptido/multímero puede unirse al soporte mediante un enlace no covalente, tal como adsorción física o adsorción biospecífica.

35 La cantidad de polipéptido/multímero acoplado puede controlarse por medio de la concentración del polipéptido/multímero usada en el proceso de acoplamiento, por medio de las condiciones de acoplamiento y activación usadas y/o por medio de la estructura de poros del soporte usado. Como regla general, la capacidad de unión absoluta de la matriz aumenta con la cantidad de polipéptido/multímero acoplado, al menos hasta un punto en el que los poros  
40 acaban siendo significativamente constreñidos por el polipéptido/multímero acoplado. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, parece que para los valores de Kd indicados para el soporte, la constricción de los poros por el ligando acoplado tiene menor importancia. La capacidad de unión relativa por mg de polipéptido/multímero acoplado disminuirá a altos niveles de acoplamiento, lo cual da como resultado un coste-beneficio óptimo dentro de los intervalos especificados anteriormente.

45 En ciertas realizaciones, los polipéptidos o multímeros se acoplan al soporte a través de enlace tioéter. Los métodos para realizar dicho acoplamiento son muy conocidos en esta técnica y los expertos en la técnica los llevan a cabo con facilidad usando técnicas y equipos convencionales. Los enlaces tioéter son flexibles y estables y, en general, adecuados para su uso en la cromatografía de afinidad. En particular, cuando el enlace tioéter es a través de un resto cisteína terminal o se realiza en una posición cercana al terminal del polipéptido o multímero, la movilidad del  
50 polipéptido/multímero acoplado se potencia, lo cual proporciona una mayor capacidad de unión y cinética de unión. En algunas realizaciones, el polipéptido/multímero se acopla a través de una cisteína C-terminal proporcionada en la proteína, como se describió anteriormente. Esto permite un acoplamiento eficaz del tiol de la cisteína a grupos electrófilos, por ejemplo, grupos epóxido, grupos halohidrina, etc., sobre un soporte, lo cual produce un acoplamiento de puente de tioéter.

55 El soporte comprende agarosa. Los soportes usados en la presente invención pueden ser preparados con facilidad según métodos convencionales, tales como la gelificación en suspensión inversa (S. Hjertén, Biochim. Biophys. Acta, 79(2), 393-398 (1964)). Como alternativa, las bases de matrices son productos disponibles en el mercado, tales como esferas de agarosa reticuladas, comercializadas con el nombre de SEPHAROSE™ FF (GE Healthcare). En una realización, que es especialmente ventajosa para separaciones a gran escala, el soporte se ha adaptado para aumentar su rigidez usando los métodos descritos en los documentos US6602990 o US7396467 y, por tanto, esto hace que la matriz sea más adecuada para caudales elevados.

En ciertas realizaciones, el soporte de agarosa está reticulado, tal como con reticulaciones de hidroxialquil éter. Los reactivos de reticulación que producen estas reticulaciones pueden ser, por ejemplo, epihalohidrinatas, tal como epiclorohidrina, diepóxidos, tales como butandiol diglicidil éter, agentes alilantes, tales como haluros de alilo o alil glicidil éter. La reticulación es beneficiosa para la rigidez del soporte y mejora la estabilidad química. Las reticulaciones de hidroxialquil éter son estables frente a álcalis y no producen una adsorción no específica significativa.

Las matrices en forma de esferas o partículas pueden usarse como un lecho cargado o en una forma suspendida. Las formas suspendidas incluyen las conocidas como lechos expandidos y suspensiones puras, en las que las partículas o las esferas pueden moverse libremente. En el caso de los monolitos, el lecho cargado y los lechos expandidos, el procedimiento de separación habitualmente se realiza después de una cromatografía convencional con un gradiente de concentración. En el caso de una suspensión pura, se usará el modo discontinuo.

En un segundo aspecto, la presente invención describe un método para aislar una inmunoglobulina, en el que se usa una matriz de separación como se describió anteriormente. El método puede comprender las etapas de:

- a) poner en contacto una muestra líquida que comprende una inmunoglobulina con una matriz de separación como se describió anteriormente,
- b) lavar la matriz de separación con un líquido de lavado,
- c) eluir la inmunoglobulina de la matriz de separación con un líquido de elución, y
- d) limpiar la matriz de separación con un líquido de limpieza, que puede comprender NaOH o KOH 0,1-1,0 M, tal como NaOH o KOH 0,4-1,0 M.

Las etapas a)-d) pueden repetirse al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces o 50-200 veces.

En ciertas realizaciones, el método comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una muestra líquida que comprende una inmunoglobulina con una matriz de separación como se describió anteriormente,
- b) lavar dicha matriz de separación con un líquido de lavado,
- c) eluir la inmunoglobulina de la matriz de separación con un líquido de elución, y
- d) limpiar la matriz de separación con un líquido de limpieza que, como alternativa, puede denominarse un líquido de limpieza en el sitio (CIP), por ejemplo, con un tiempo de contacto (incubación) de al menos 10 min.

El método también puede comprender las etapas de proporcionar, antes de la etapa a), una matriz de separación por afinidad según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, y proporcionar una disolución que comprende una inmunoglobulina y al menos otra sustancia, tal como una muestra líquida y, después de la etapa c), recuperar el eluato y opcionalmente someter el eluato a otras etapas de separación, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía multimodal y/o cromatografía de interacción hidrófoba. Las composiciones adecuadas de la muestra líquida, el líquido de lavado y el líquido de elución, así como las condiciones generales para realizar la separación son muy conocidas en la técnica de la cromatografía de afinidad y, en particular, en la técnica de la cromatografía de proteína A. La muestra líquida que comprende una proteína que contiene Fc y al menos otra sustancia puede comprender proteínas de la célula huésped ("host cell proteins", HCP), tales como proteínas de células CHO, *E. coli* o levaduras. El contenido en proteínas de células CHO y *E. coli* puede determinarse de modo conveniente mediante inmunoensayos dirigidos hacia estas proteínas, por ejemplo, los kits de ELISA HCP de CHO o HCP de *E. coli* de Cygnus Technologies. Las proteínas de la célula huésped o las proteínas de células CHO/*E. coli* pueden desorberse durante la etapa b).

La elución puede realizarse usando cualquier disolución adecuada empleada para la elución de un medio de proteína A. Esta puede ser, por ejemplo, una disolución o tampón con pH 5 o menor, tal como pH 2,5-5 o 3-5. En algunos casos, también puede ser una disolución o tampón con pH 11 o mayor, tal como pH 11-14 o pH 11-13. En algunas realizaciones, el tampón de elución o el gradiente de tampón de elución comprende al menos un ácido carboxílico mono-, di- o trifuncional o una sal de dicho ácido carboxílico. En algunas realizaciones, el tampón de elución o el gradiente de tampón de elución comprende al menos una especie aniónica seleccionada del grupo que consiste en acetato, citrato, glicina, succinato, fosfato y formiato.

En algunas realizaciones, el líquido de limpieza es alcalino, tal como con un pH de 13-14. Estas disoluciones proporcionan una eficaz limpieza de la matriz, en particular en el extremo superior del intervalo.

En ciertas realizaciones, el líquido de limpieza comprende NaOH o KOH 0,1-2,0 M, tal como NaOH o KOH 0,5-2,0 o 0,5-1,0 M. Estas son disoluciones de limpieza eficaces y, en particular, cuando la concentración de NaOH o KOH es mayor que 0,1 M o al menos 0,5 M. La alta estabilidad de los polipéptidos de la invención permite el uso de dichas disoluciones fuertemente alcalinas.

El método también puede incluir una etapa de desinfectar la matriz con un líquido desinfectante, que puede comprender, por ejemplo, un peróxido, tal como peróxido de hidrógeno y/o un perácido, tal como ácido peracético o ácido perbórmico.

En algunas realizaciones, las etapas a)-d) se repiten al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces, 50-200, 50-300 o 50-500 veces. Esto es importante para la economía del proceso, ya que la matriz puede reutilizarse muchas veces.

- 5 Las etapas a)-c) también pueden repetirse al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces, 50-200, 50-300 o 50-500 veces, y la etapa d) puede realizarse después de una pluralidad de ejecuciones de la etapa c), de modo que la etapa d) se ejecuta al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces. La etapa d) puede realizarse, por ejemplo, cada segunda a vigésima ejecución de la etapa c).

### Ejemplos

#### 10 Mutagénesis de proteínas

Se realizó una mutagénesis dirigida específica de sitio mediante una PCR en dos etapas usando oligonucleótidos que codifican las mutaciones. Se empleó como molde un plásmido que contenía un único dominio de Z, B o C. Los fragmentos de PCR se acoplaron en un vector de expresión de *E. coli*. Se utilizó la secuenciación del ADN para verificar la secuencia correcta de los fragmentos insertados. Para formar multímeros de los mutantes, se usó un sitio Acc I emplazado en los codones de inicio (GTA GAC) del dominio B, C o Z, que corresponde con los aminoácidos VD. El vector para el dominio monomérico se digirió con Acc I y se trató con fosfatasa. Se diseñaron cebadores de extremos pegajosos de Acc I específicos para cada variante y se generaron dos productos PCR solapantes a partir de cada molde. Los productos de PCR se purificaron y se calculó la concentración comparando los productos de PCR en un gel de agarosa al 2 %. Se hibridaron cantidades equivalentes de los productos de PCR apareados (90 °C -> 25 °C en 45 min) en tampón de acoplamiento. El producto resultante consiste en aproximadamente ¼ de fragmentos que probablemente se acoplen en un sitio Acc I (fragmentos de PCR correctos y/o el vector digerido). Después del acoplamiento y la transformación, las colonias se seleccionaron mediante PCR para identificar las construcciones que contenían el mutante deseado. Los clones positivos se verificaron mediante secuenciación de ADN.

#### Expresión de construcciones y purificación

25 Las construcciones se expresaron en el periplasma bacteriano mediante fermentación de *E. coli* K12 en medio convencional. Después de la fermentación, las células se trataron con calor para liberar el contenido del periplasma hacia el medio. Las construcciones liberadas hacia el medio se recuperaron mediante microfiltración con una membrana que tenía un tamaño de poro de 0,2 µm.

30 Cada construcción, ahora en la forma de permeado procedente de la etapa de filtración, se purificó mediante afinidad. El permeado se cargó sobre un medio de cromatografía que contenía IgG inmovilizada (IgG Sepharose 6FF, GE Healthcare). El producto cargado se lavó con disolución salina tamponada con fosfato y se eluyó disminuyendo el pH.

35 La reunión de elución se ajustó a un pH neutro (pH 8) y se redujo mediante la adición de ditiotreitol. Después la muestra se cargó sobre un intercambiador aniónico. Después de una etapa de lavado, la construcción se eluyó en un gradiente de NaCl para separarla de cualquier contaminante. La reunión de elución se concentró mediante ultrafiltración hasta 40-50 mg/ml. Debe advertirse que el éxito de la purificación de afinidad de una construcción sobre un medio con IgG inmovilizada indica que la construcción en cuestión tiene una alta afinidad por IgG.

Los ligandos purificados se analizaron con RPC LC-MS para determinar la pureza y para asegurar que el peso molecular se corresponde con el esperado (basándose en la secuencia de aminoácidos).

#### Ejemplo 1

40 Los ligandos monoméricos purificados listados en la tabla 1, que comprenden además para SEQ ID NO:8-16, 23-28 y 36-48 una secuencia conductora AQGT en el N-terminal y una cisteína en el C-terminal, se inmovilizaron sobre chips detectores Biacore CM5 (GE Healthcare, Suecia) usando el kit de acoplamiento de aminos de GE Healthcare (para el acoplamiento de carbodiimida de aminos sobre los grupos carboximetilo sobre el chip) en una cantidad suficiente para obtener una potencia de señal de aproximadamente 200-1500 RU en un instrumento de resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR) Biacore (GE Healthcare, Suecia). Para comprobar la capacidad de unión a IgG de la superficie inmovilizada, se hizo fluir 1 mg/ml de IgG policlonal humana (Gammanorm) sobre el chip y se registró la potencia de la señal (proporcional a la cantidad de unión). Después la superficie se limpió en el sitio (CIP), es decir, se enjuagó con NaOH 500 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 2 °C). Esto se repitió para 96-100 ciclos y se siguió la estabilidad alcalina del ligando inmovilizado como la capacidad de unión a IgG remanente (potencia de la señal) después de cada ciclo. Los resultados se muestran en la tabla 1 e indican que al menos los ligandos Zvar(N11K)1, Zvar(N11E)1, Zvar(N11Y)1, Zvar(N11T)1, Zvar(N11F)1, Zvar(N11L)1, Zvar(N11W)1, ZN11I)1, Zvar(N11M)1, Zvar(N11V)1, Zvar(N11A)1, Zvar(N11H)1, Zvar(N11R)1, Zvar(N11E,Q32A)1, Zvar(N11E,Q32E,Q40E)1 and Zvar(N11E,Q32E,K50R)1, Zvar(Q9A,N11E,N43A)1, Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)1, Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)1, Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1, Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)1, Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1, Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1, Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1,

## ES 2 874 974 T3

5 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1 y Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)1, así como las variedades de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 que contienen G, S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K en la posición 29, las variedades de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 que contienen F, Y, W, K o R en la posición 53, y las variedades de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 en las que Q9, Q40, A42 o N43 han sido delecionados, tienen una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar1, usada como referencia. Además, los ligandos B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 y C(Q9A,N11E,E43A)1 presentan una estabilidad mejorada en comparación con los dominios B y C originarios, usados como referencias.

Tabla 1. Ligandos monoméricos, evaluados mediante Biacore (NaOH 0,5 M).

Ligando	Secuencia	Capacidad después de 96-100 ciclos	Capacidad de referencia después de 96-100 ciclos	Capacidad con relación a la referencia
Zvar(N11E,Q32A)1	SEQ ID NO:12	57 %	55 %	1,036
Zvar(N11E)1	SEQ ID NO:13	59 %	55 %	1,073
Zvar(N11E,Q32E,Q40E)1	SEQ ID NO:14	52 %	51 %	1,020
Zvar(N11E,Q32E,K50R)1	SEQ ID NO:15	53 %	51 %	1,039
Zvar(N11K)1	SEQ ID NO:16	62 %	49 %	1,270
Zvar(N11Y)1	SEQ ID NO:38	55 %	46 %	1,20
Zvar(N11T)1	SEQ ID NO:39	50 %	46 %	1,09
Zvar(N11F)1	SEQ ID NO:40	55 %	46 %	1,20
Zvar(N11L)1	SEQ ID NO:41	57 %	47 %	1,21
Zvar(N11W)1	SEQ ID NO:42	57 %	47 %	1,21
Zvar(N11I)1	SEQ ID NO:43	57 %	47 %	1,21
Zvar(N11M)1	SEQ ID NO:44	58 %	46 %	1,26
Zvar(N11V)1	SEQ ID NO:45	56 %	46 %	1,22
Zvar(N11A)1	SEQ ID NO:46	58 %	46 %	1,26
Zvar(N11H)1	SEQ ID NO:47	57 %	46 %	1,24
Zvar(N11R)1	SEQ ID NO:48	59 %	46 %	1,28
Zvar(Q9A,N11E,N43A)1	SEQ ID NO:8	70 %	47 %	1,49
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)1	SEQ ID NO:9	68 %	47 %	1,45
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)1	SEQ ID NO:10	67 %	47 %	1,43
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:11	66 %	47 %	1,40
Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:24	65 %	48 %	1,35
Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1	SEQ ID NO:23	67 %	46 %	1,46
Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1	SEQ ID NO:25	59 %	46 %	1,28
Zvar(N11K,H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1	SEQ ID NO:26	59 %	45 %	1,31
Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1	SEQ ID NO:27	63 %	45 %	1,40

ES 2 874 974 T3

Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)1	SEQ ID NO:28	67 %	45 %	1,49
B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:36	39 %	35 %	1,11
C(Q9A,N11E,E43A)1	SEQ ID NO:37	60 %	49 %	1,22
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29G</b> ,Q40V,A42K,N43 A,L44I)1	SEQ ID NO:54	69 %	48 %	1,44
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29S</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:55	66 %	48 %	1,38
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29Y</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:56	61 %	48 %	1,27
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29Q</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:57	60 %	47 %	1,28
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29T</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 1	SEQ ID NO:58	60 %	47 %	1,28
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29N</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:59	61 %	47 %	1,30
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29F</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:60	62 %	46 %	1,35
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29L</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:61	61 %	46 %	1,33
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29W</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:62	60 %	46 %	1,30
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29I</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:63	58 %	47 %	1,23
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29M</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:64	62 %	47 %	1,32
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29V</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:65	62 %	47 %	1,32
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29D</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:66	56 %	47 %	1,19
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29E</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:67	57 %	47 %	1,21
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29H</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 1	SEQ ID NO:68	57 %	47 %	1,21
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29R</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:69	58 %	46 %	1,26
Zvar(Q9A,N11E, <b>A29K</b> ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:70	59 %	46 %	1,28
Zvar(Q9A,N 11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, <b>D53F</b> ) 1	SEQ ID NO:71	58 %	46 %	1,26
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, <b>D53Y</b> )1	SEQ ID NO:72	59 %	46 %	1,28
Zvar(Q9A,N 11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, <b>D53W</b> ) 1	SEQ ID NO:73	62 %	46 %	1,35
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, <b>D53K</b> )1	SEQ ID NO:74	65 %	46 %	1,41
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, <b>D53R</b> )1	SEQ ID NO:75	60 %	46 %	1,30
Zvar( <b>Q9del</b> ,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:76	60 %	46 %	1,30
Zvar(Q9A,N11E, <b>Q40del</b> ,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:77	59 %	46 %	1,28
Zvar(Q9A,N11E,Q40V, <b>A42del</b> ,N43A,L44I)1	SEQ ID NO:78	57 %	46 %	1,24
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K, <b>N43del</b> ,L44I) 1	SEQ ID NO:79	55 %	46 %	1,20

El experimento Biacore también puede usarse para determinar las constantes de unión y disociación entre el ligando e IgG. Esto se usó con la configuración según se describió anteriormente y con un anticuerpo monoclonal IgG1 como molécula de sonda. Para el Zvar1 de referencia, la constante de unión ( $10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ) fue de 3,1 y la constante de disociación ( $10^5 \text{ s}^{-1}$ ) fue de 22,1, que producen una afinidad (constante de disociación/constante de unión) de 713 pM. Para Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 (SEQ ID NO:11), la constante de unión fue de 4,1 y la constante de disociación fue de 43,7, con una afinidad de 1070 pM. Por tanto, la afinidad por IgG fue algo mayor en el variante mutado.

5

## Ejemplo 2

Los ligandos diméricos, tetraméricos y hexaméricos purificados listados en la tabla 2 se inmovilizaron sobre chips detectores Biacore CM5 (GE Healthcare, Suecia) usando el kit de acoplamiento de aminas de GE Healthcare (para el acoplamiento de carbodiimida de aminas sobre los grupos carboximetilo sobre el chip) en una cantidad suficiente para obtener una potencia de señal de aproximadamente 200-1500 RU en un instrumento Biacore (GE Healthcare, Suecia) . Para comprobar la capacidad de unión a IgG de la superficie inmovilizada, se hizo fluir 1 mg/ml de IgG policlonal humana (Gammanorm) sobre el chip y se registró la potencia de la señal (proporcional a la cantidad de unión). Después la superficie se limpió en el sitio (CIP), es decir, se enjuagó con NaOH 500 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 2 °C). Esto se repitió para 300 ciclos y se siguió la estabilidad alcalina del ligando inmovilizado como la capacidad de unión a IgG remanente (potencia de la señal) después de cada ciclo. Los resultados se muestran en la tabla 2 y en la figura 2, e indican que al menos los ligandos Zvar(Q9A,N11E,N43A)4, Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4, Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4 y Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4 presentan una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar4, que se usó como referencia. El ligando hexamérico Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6 también presentó una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar6, usada como referencia. Además, los dímeros de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) con deleciones de a) D2,A3,K4; b) K58,V1,D2; c) P57,K58,V1,D2,A3; d) K4,F5,D6,K7,E8; e) A56,P57,K58; V1,D2,A3 o f) V1,D2,A3,K4,F5,D6,K7,E8 de la región de conector entre las dos unidades monoméricas presentan una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar2, usada como referencia. Además, los dímeros de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) con una inserción de YEDG entre K58 y V1 en la región de conector presentan una estabilidad alcalina mejorada en comparación con Zvar2.

Tabla 2. Ligandos diméricos, tetraméricos y hexaméricos evaluados mediante Biacore (NaOH 0,5 M).

Ligando	SEQ ID NO:	Capacidad remanente 100 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 100 ciclos	Capacidad remanente 200 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 200 ciclos	Capacidad remanente 300 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 300 ciclos
Zvar4	21	67	1	36	1	16	1
Zvar(Q9A,N11E,N43A)4	17	81	1,21	62	1,72	41	2,56
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	18	80	1,19	62	1,72	42	2,62
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4	19	84	1,25	65	1,81	48	3,00
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	90	1,34	74	2,06	57	3,56
Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	32	84	1,24	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6	33	87	1,30	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	34	81	1,13	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)4	35	84	1,17	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con D2, A3 y K4 en el conector delecionados	80	70	1,27	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K58, V1 y D2 en el conector delecionados	81	76	1,38	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con P57, K58, V1, D2 y A3 en el conector delecionados	82	74	1,35	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado

Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K4, F5, D6, K7 y E8 en el conector deleccionados	83	70	1,30	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con A56, P57 y K58 en el conector deleccionados	84	68	1,26	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2 y A3 en el conector deleccionados	85	75	1,39	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2, A3, K4, F5, D6, K7 y E8 en el conector deleccionados	86	62	1,13	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con YEDG insertado en el conector entre K58 y V1	87	72	1,31	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar2	88	55	1	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado

Ejemplo 3

Se repitió el ejemplo 2 con 100 ciclos de CIP de tres ligandos usando NaOH 1 M en lugar de 500 mM como en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en la tabla 3 y demuestran que los tres ligandos presentan una estabilidad alcalina mejorada también en NaOH 1 M, en comparación con la estructura originaria Zvar4 que se usó como referencia.

5 Tabla 3. Ligandos tetraméricos, evaluados mediante Biacore (NaOH 1 M).

Ligando	Secuencia	Capacidad remanente 100 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 100 ciclos
Zvar4	SEQ ID NO:21	27	1
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	SEQ ID NO:18	55	2,04
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4	SEQ ID NO:19	54	2,00
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	SEQ ID NO:20	56	2,07

Ejemplo 4

10 Los ligandos tetraméricos purificados de la tabla 2 (todos con una cisteína N-terminal adicional) se inmovilizaron sobre esferas de agarosa usando los métodos descritos a continuación y se evaluaron para la capacidad y la estabilidad. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 3.

Tabla 4. Matrices con ligandos tetraméricos, evaluados en columnas (NaOH 0,5 M).

Ligando	SEQ ID NO	Contenido en ligando (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 inicial (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 remanente después de seis ciclos de 4 h (mg/ml)	Capacidad de IgG remanente después de seis ciclos de 4 h (%)	Capacidad de retención con relación a la ref. después de seis ciclos de 4 h
Zvar4	21	7	52,5	36,5	60	1
Zvar4	21	12	61,1	43,4	71	1
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	18	7,0	49,1	44,1	90	1,50
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	18	12,1	50,0	46,2	93	1,31
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	7,2	49,0	44,2	90	1,50
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	12,8	56,3	53,6	95	1,34
Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4	30	9,7	56,3	52,0	92	1,53
Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)4	31	10,8	56,9	52,5	92	1,30

#### Activación

5 La base de matriz usada fue de esferas de agarosa reticuladas rígidas con una mediana del diámetro (ponderada por volumen, d50V) de 85 micrómetros, preparada según los métodos del documento US6602990 y con un tamaño de poro correspondiente a un valor de Kav de 0,70 para dextrano de Pm 110 kDa medido mediante una cromatografía de filtración en gel inversa, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, pp. 6-13.

10 Se mezclaron 25 mL (g) de la base de matriz drenada, 10,0 mL de agua destilada y 2,02 g de NaOH (s) en un matraz de 100 mL con agitación mecánica durante 10 min a 25 °C. Se añadieron 4,0 mL de epiclorohidrina, y la reacción se desarrolló durante 2 horas. El gel activado se lavó con 10 volúmenes de sedimento de gel (GV) de agua.

#### Acoplamiento

15 A 20 mL de una disolución de ligando (50 mg/mL) en un tubo Falcon de 50 ml se le añadieron 169 mg de NaHCO<sub>3</sub>, 21 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 175 mg de NaCl y 7 mg de EDTA. El tubo Falcon se colocó en una mesa rodante durante 5-10 min, y después se añadieron 77 mg de DTE. La reducción se desarrolló durante >45 min. Después la disolución de ligando se desaló en una columna PD10 cargada con Sephadex G-25. El contenido en ligando de la disolución desalada se determinó midiendo la absorción de UV a 276 nm.

20 El gel activado se lavó con 3-5 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM, pH 8,6} y después el ligando se acopló según el método descrito en el documento US6399750. Todos los tampones usados en los experimentos habían sido desgasificados con nitrógeno gaseoso durante al menos 5-10 min. El contenido en ligando de los geles puede controlarse variando la cantidad y la concentración de la disolución de ligando.

25 Después de la inmovilización, los geles se lavaron 3xGV con agua destilada. Los geles + 1 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM/tioglicerol al 10%, pH 8,6} se mezclaron y los tubos se dejaron en una mesa de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después los geles se lavaron alternativamente con 3xGV {TRIS 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 8,6} y HAc 0,5 M HAc y después 8-10xGV con agua destilada. Se enviaron muestras del gel a un laboratorio externo para el análisis de aminoácidos y se calculó el contenido en ligando (mg/ml de gel) a partir del contenido en aminoácidos total.

#### Proteínas

Gammanorm 165 mg/ml (Octapharma), diluido hasta 2 mg/ml en tampón de equilibrio.

#### Tampón de equilibrio

30 PBS tampón fosfato 10 mM + NaCl 0,14 M + KCl 0,0027 M, pH 7,4 (Medicago)

#### Tampón de adsorción

PBS tampón fosfato 10 mM + NaCl 0,14 M + KCl 0,0027 M, pH 7,4 (Medicago)

Tampones de elución

Acetato 100 mM, pH 2,9

Capacidad de unión dinámica

- 5 Se cargaron 2 ml de resina en columnas TRICORN™ 5/100. Se determinó la capacidad de remoción con un sistema ÄKTAEplorer 10 a un tiempo de residencia de 6 minutos (0,33 ml/min de caudal). Se hizo pasar tampón de equilibrio a través de la columna de desviación hasta que se obtuvo una línea de base estable. Esto se realizó antes del establecimiento del cero automático. La muestra se aplicó a una columna hasta que se obtuvo una señal de UV del 100 %. Después se volvió a aplicar tampón de equilibrio hasta que se obtuvo una línea de base estable.
- 10 La muestra se cargó en la columna hasta que alcanzó una señal de UV del 85 % de absorbancia máxima. Después la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio a un caudal de 0,5 ml/min. La proteína se eluyó con 5 CV de tampón de elución a un caudal de 0,5 ml/min. Después, la columna se limpió con NaOH 0,5 M a un caudal de 0,2 ml/min y se reequilibró con tampón de equilibrio.
- 15 Para el cálculo de la capacidad de remoción al 10 % se usó la siguiente ecuación, que es la cantidad de IgG que se carga en la columna hasta que la concentración de IgG en el efluente de la columna sea 10 % de la concentración de IgG en la alimentación.

$$q_{10\%} = \frac{C_0}{V_C} \left[ V_{app} - V_{sys} - \int_{V_{sys}}^{V_{app}} \frac{A(V) - A_{sub}}{A_{100\%} - A_{sub}} * dv \right]$$

$A_{100\%}$  = 100 % de la señal UV;

$A_{sub}$  = contribución a la absorbancia de la subclase IgG que no se une;

- 20  $A(V)$  = absorbancia a un volumen aplicado dado;

$V_C$  = volumen de columna;

$V_{app}$  = volumen aplicado hasta una depuración del 10 %;

$V_{sys}$  = volumen muerto del sistema;

$C_0$  = concentración de la alimentación.

- 25 Se calculó la capacidad de unión dinámica (DBC) a una depuración del 10 %. Se calculó la capacidad de unión dinámica (DBC) para una depuración del 10 y 80 %.

CIP - NaOH 0,5 M

- 30 Se determinó la DBC de depuración al 10 % (Qb10) antes y después de exposiciones repetidas a disoluciones de limpieza alcalinas. Cada ciclo incluyó una etapa de CIP con NaOH 0,5 M bombeado a través de la columna a un caudal de 0,5/min durante 20 min, tras lo cual la columna se dejó en reposo durante 4 h. La exposición se realizó a temperatura ambiente (22 +/- 2 °C). Después de esta incubación, la columna se lavó con tampón de equilibrio durante 20 min a un caudal de 0,5 ml/min. La tabla 4 muestra la capacidad remanente después de seis ciclos de 4 h (es decir, un tiempo de exposición acumulado de 24 h a NaOH 0,5 M), en números absolutos y con relación a la capacidad inicial.

Ejemplo 5

- 35 Se repitió el ejemplo 4 con los ligandos tetraméricos mostrados en la tabla 5, pero se usó NaOH 1,0 M en las etapas de CIP en lugar de 0,5 M. Los resultados se muestran en la tabla 5 y en la figura 4.

Tabla 5. Matrices con ligandos tetraméricos, evaluados en columnas - NaOH 1,0 M.

Ligando	SEQ ID NO	Contenido en ligando (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 inicial (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 remanente después de seis ciclos de 4 h (mg/ml)	Capacidad de IgG remanente después de seis ciclos de 4 h (%)	Capacidad de retención con relación a la ref. después de seis ciclos de 4 h
Zvar4	21	12	60,1	33,5	56	1
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	12,8	60,3	56,0	93	1,67
Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4	30	9,7	62,1	48,1	77	1,44

## Ejemplo 6

5

## Bases de matrices

10

Las bases de matrices usadas fueron un conjunto de muestras de esferas de agarosa reticuladas rígidas con una mediana del diámetro (ponderada por volumen, d50V) de 59-93 micrómetros (determinada en un instrumento de difracción de láser a Malvern Mastersizer 2000), preparadas según los métodos del documento US6602990 y con un tamaño de poro correspondiente a un valor de Kd de 0,62-0,82 para dextrano de Pm 110 kDa medido mediante una cromatografía de filtración en gel inversa, según los métodos descritos anteriormente, usando columnas HR10/30 (GE Healthcare) cargadas con los prototipos en NaCl 0,2 M y con una gama de fracciones de dextrano como moléculas de sonda (caudal 0,2 ml/min). El peso seco de las muestras de esferas variaba de 53 a 86 mg/ml, según se determina secando 1,0 ml de muestras de tortas de filtro drenadas a 105 °C a lo largo de la noche y después pesándolas.

15

Tabla 6. Muestras de bases de matrices

Base de matriz	Kd	d50v (µm)	Peso seco (mg/ml)
A18	0,704	59,0	56,0
A20	0,70	69,2	55,8
A27	0,633	87,2	74,2
A28	0,638	67,4	70,2
A29	0,655	92,6	57,5
A32	0,654	73,0	70,5
A33	0,760	73,1	55,5
A38	0,657	70,9	56,2
A39	0,654	66,0	79,1
A40	0,687	64,9	74,9
A41	0,708	81,7	67,0
A42	0,638	88,0	59,4
A43	0,689	87,5	77,0
A45	0,670	56,6	66,0
A52	0,620	53,10	63,70
A53	0,630	52,6	86,0
A54	0,670	61,3	75,3

ES 2 874 974 T3

A55	0,640	62,0	69,6
A56	0,740	61,0	56,0
A56-2	0,740	51,0	56,0
A62a	0,788	48,8	70,1
A62b	0,823	50,0	46,9
A63a	0,790	66,8	59,6
A63b	0,765	54,0	79,0
A65a	0,796	58,0	60,0
A65b	0,805	57,3	46,0
B5	0,793	69,0	84,4
C1	0,699	71,0	73,4
C2	0,642	66,5	81,1
C3	0,711	62,0	82,0
C4	0,760	62,0	82,0
H31	0,717	82,0	59,0
H35	0,710	81,1	61,0
H40	0,650	52,8	65,0
I1	0,640	50,0	67,0
41	0,702	81,6	60,6
517	0,685	87,9	64,4
106	0,692	86,7	64,6
531C	0,661	51,7	63,8
P10	0,741	59,3	70,0
S9	0,736	64,1	72,2

Acoplamiento

5 Se lavaron 100 ml de base de matriz con 10 volúmenes de gel de agua destilada sobre un filtro de vidrio. El gel se pesó (1 g = 1 ml) y se mezcló con 30 ml de agua destilada y 8,08 g de NaOH (0,202 mol) en un matraz de 250 ml con un agitador. La temperatura se ajustó a 27 +/- 2 °C en un baño de agua. Se añadieron 16 ml de epiclorohidrina (0,202 mol) con agitación vigorosa (aproximadamente 250 rpm) durante 90 +/- 10 minutos. Se dejó que la reacción se desarrollase durante 80 +/- 10 minutos más y después el gel se lavó con >10 volúmenes de gel de agua destilada sobre un filtro de vidrio hasta que se alcanzó un pH neutro. Este gel activado se usó directamente para el acoplamiento como se indica a continuación.

10 A 16,4 mL de una disolución de ligando (50 mg/mL) en un tubo Falcon de 50 ml se le añadieron 139 mg de NaHCO<sub>3</sub>, 17,4 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 143,8 mg de NaCl y 141 mg de EDTA. El tubo Falcon se colocó en una mesa rodante durante 5-10 min, y después se añadieron 63 mg de DTE. La reducción se desarrolló durante >45 min. Después la disolución de ligando se desaló en una columna PD10 cargada con Sephadex G-25. El contenido en ligando de la disolución desalada se determinó midiendo la absorción de UV a 276 nm.

15 El gel activado se lavó con 3-5 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM, pH 8,6} y después el ligando se acopló según el método descrito en el documento US6399750 5.2.2, aunque con unas cantidades de ligando considerablemente mayores (véase a continuación). Todos los tampones usados en los experimentos habían sido desgasificados con nitrógeno gaseoso durante al menos 5-10 min. El contenido en ligando de los geles se controló variando la cantidad y la

concentración de la disolución de ligando, añadiendo 5-20 mg de ligando por ml de gel. El ligado era un tetrámero (SEQ ID NO:20) o un hexámero (SEQ ID NO:33) de un mutante estabilizado frente a álcalis.

- 5 Después de la inmovilización, los geles se lavaron 3xGV con agua destilada. Los geles + 1 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM/tioglicerol al 10%, pH 8,6} se mezclaron y los tubos se dejaron en una mesa de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después los geles se lavaron alternativamente con 3xGV {TRIS 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 8,6} y HAc 0,5 M HAc y después 8-10xGV con agua destilada. Se enviaron muestras del gel a un laboratorio externo para el análisis de aminoácidos y se calculó el contenido en ligando (mg/ml de gel) a partir del contenido en aminoácidos total.

#### Evaluación

- 10 Se determinó la capacidad dinámica Qb10 % para una IgG humana policlonal a 2,4 y 6 min de tiempo de residencia como se indica en el ejemplo 4.

Tabla 7. Resultados del prototipo

Prototipo	Base de matriz	Contenido en ligando (mg/ml)	Multímero	Qb10 % 2,4 min (mg/ml)	Qb10 % 6 min (mg/ml)
N1	A38	7,45	tetrámero	44,4	58,25
N2	A20	7,3	tetrámero	45,12	57,21
N3	A42	6,72	tetrámero	33,56	50,02
N4	A29	7,3	tetrámero	36,34	51,8
N5	A28	7,9	tetrámero	42,38	58,25
N6	A39	6,96	tetrámero	41,88	54,67
N7	A27	7,5	tetrámero	29,19	48,73
N8	A43	6,99	tetrámero	33,43	49,79
N9	A38	11,34	tetrámero	48,1	72,78
N10	A20	10,6	tetrámero	50,66	70,07
N11	A42	11,1	tetrámero	32,25	57,78
N12	A29	11	tetrámero	34,85	64,68
N13	A28	11,9	tetrámero	39,92	63,75
N14	A39	10,48	tetrámero	44,37	64,79
N15	A27	12,1	tetrámero	24,8	55,56
N16	A43	10,51	tetrámero	31,82	58,04
N17	A41	8,83	tetrámero	38,5	56,8
N18	A41	8,83	tetrámero	37,84	58,6
N19	A41	8,83	tetrámero	35,06	57,23
N20	A41	5,0	tetrámero	35,64	46,04
N21	A41	13,0	tetrámero	34,95	62,23
N22	A40	13,15	tetrámero	56,85	71,09
N23	A33	7,33	tetrámero	48,69	55,76
N24	A40	11,03	tetrámero	54,96	73,8
033A	A38	7,5	tetrámero	44	58

ES 2 874 974 T3

033B	A38	11,3	tetrámero	48	73
097A	A20	7,3	tetrámero	45	57
097B	A20	10,6	tetrámero	51	70
003A	A28	7,9	tetrámero	42	58
003B	A28	11,9	tetrámero	40	64
003C	A28	15,8	tetrámero	37	67
038A	A39	7,0	tetrámero	42	55
038B	A39	10,5	tetrámero	44	65
074	A40	13,2	tetrámero	57	71
093	A33	7,3	tetrámero	49	56
058A	A40	11,0	tetrámero	55	74
077	A18	8,2	tetrámero	52	59
010	A32	10,7	tetrámero	40	57
099	A32	13,3	tetrámero	37	66
030A	B5	6,3	tetrámero	32	38
030B	B5	9,6	tetrámero	45	47
293A	C1	5,4	tetrámero	38	47
293B	C1	10,8	tetrámero	43	60
294A	C2	5,1	tetrámero	39	46
294B	C2	10,5	tetrámero	42	57
336A	H40	5,6	tetrámero	47	52
336B	H40	9,1	tetrámero	52	67
091	A18	13,4	tetrámero	N/A	63
092	A20	12,8	tetrámero	49	67
080	A33	9,4	tetrámero	51	58
089	A40	6,1	tetrámero	49	59
688A	A62a	6,6	tetrámero	41	46
688B	A62a	14,8	tetrámero	55	62
871	A62a	9,7	tetrámero	48	60
934A	A63a	6,6	tetrámero	40	44
934B	A63a	14,0	tetrámero	48	56
017B	A65a	13,1	tetrámero	56	64
041A	A62b	5,2	tetrámero	40	N/A
041B	A62b	11,1	tetrámero	52	N/A
116A	A65b	5,8	tetrámero	42	46

ES 2 874 974 T3

116B	A65b	8,8	tetrámero	49	56
017A	A65a	6,1	tetrámero	40	44
387A	A62a	6,4	tetrámero	43	45
387B	A62a	7,5	tetrámero	47	56
432	A63a	6,1	tetrámero	39	44
433A	A65a	6,6	tetrámero	42	47
433B	A65a	13,6	tetrámero	52	61
579A	I1	6,1	tetrámero	45	51
579B	I1	11,2	tetrámero	57	68
064A	C3	5,9	tetrámero	44	52
064B	C3	9,0	tetrámero	49	62
064C	C3	14,3	tetrámero	51	70
352A	C4	10,1	tetrámero	55	63
352B	C4	14,4	tetrámero	59	67
066A	C3	6,8	hexámero	48	59
066B	C3	11,9	hexámero	51	73
066C	C3	15,1	hexámero	43	61
353A	C4	11,2	hexámero	62	74
353B	C4	15,2	hexámero	57	82
872A	A62a	9,6	hexámero	56	72
872B	A62a	14,5	hexámero	62	84
869A	H40	6,9	hexámero	50	56
869B	H40	14,3	hexámero	56	75
869C	H40	23,0	hexámero	41	65
962A	H35	6,8	hexámero	36	49
962B	H35	12,3	hexámero	31	54
962C	H35	20,3	hexámero	20	43
112A	A56	7,9	hexámero	47	55
112B	A56	12,4	hexámero	57	73
112C	A56	19,2	hexámero	55	80
113A	A56	7,1	hexámero	48	57
113B	A56	12,4	hexámero	53	73
113C	A56	15,2	hexámero	48	76
212A	H31	6,5	hexámero	37	38
212B	H31	10,4	hexámero	50	61

ES 2 874 974 T3

212C	H31	20,0	hexámero	31	52
213A	A33	6,5	hexámero	44	53
213B	A33	10,9	hexámero	50	65
213C	A33	11,1	hexámero	50	68
432A	A20	6,4	hexámero	41	56
432B	A20	12,4	hexámero	38	64
432C	A20	21,1	hexámero	44	43
433A	A38	5,9	hexámero	47	57
433B	A38	11,6	hexámero	48	72
433C	A38	15,8	hexámero	36	62
742A	A54	6,7	hexámero	38	46
742B	A54	12,6	hexámero	45	52
742C	A54	21,1	hexámero	38	65
726A	A63b	6,4	hexámero	42	46
726B	A63b	10,6	hexámero	49	60
726C	A63b	16,7	hexámero	53	69
793A	A56-2	6,8	hexámero	50	58
793B	A56-2	12,5	hexámero	59	72
793C	A56-2	19,2	hexámero	61	82
517	517	12,0	tetrámero*	35	56
106	106	5,8	tetrámero*	33	45
531C	531C	11,2	tetrámero*	54	65
P10	P10	19,0	hexámero		76
S9	S9	18,4	hexámero	56	75
*SEQ ID NO:21					

Ejemplo 7

5 Una serie de prototipos, preparados como se indicó anteriormente, con diferente contenido en ligando (tetrámero, SEQ ID NO:20) se incubaron en NaOH 1 M durante 4, 8 y 31 horas a 22 +/- 2 °C y se midió la capacidad de IgG dinámica (Qb10 %, 6 min de tiempo de residencia) antes y después de la incubación. Los prototipos se muestran en la tabla 8 y los resultados en las figuras 5 y 6. Puede observarse que la estabilidad frente a este tratamiento riguroso con álcalis aumenta a medida que aumenta el contenido en ligando.

Tabla 8. Muestras para la incubación en NaOH 1 M

Prototipo	Contenido en ligando (mg/ml)	Qb10 %, 6 min, antes de la incubación (mg/ml)
N1	12	78
LE28	13	79
N17	16	73
N16	20	73

## Ejemplo 8

## Ensayo de presión-flujo de matrices

- 5 Se cargaron 300 ml de matriz sedimentada en una columna FineLine™ 35 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) con un diámetro interno de 35 mm y una altura del tubo de 330 mm. El gel se suspendió en agua destilada para producir un volumen de suspensión de 620 ml, y la altura del lecho cargado fue de 300 +/- 10 mm. La presión de carga fue de 0,10 +/- 0,02 bares (10 +/- 2 kPa).
- 10 Después se bombeó agua destilada a través de la columna a velocidades de bomba crecientes y se midió el caudal (expresado como la velocidad de flujo lineal, cm/h) y la contrapresión (MPa) después de 5 min para cada configuración de bomba. Las mediciones continuaron hasta que se alcanzó un caudal máximo y una presión máxima, es decir, el caudal y la contrapresión logradas cuando el caudal empieza a disminuir a medida que aumenta la contrapresión.

Tabla 9. Actuación de presión-flujo de matrices

Matriz	Máxima velocidad de flujo, cm/h	Presión máxima (MPa)
517	1343	0,56
106	1306	0,56
531C	513	0,51
P10	862	0,60
S9	1172	0,64

- 15 Las matrices P10 y S9 tiene mayor rigidez, tal como lo indica la presión máxima, y, por tanto, pueden aguantar velocidades de flujo comparativamente más altas a pesar de sus bajas medianas de diámetro de partícula (59-64 micrómetros).

## 20 LISTA DE SECUENCIAS

<110> GE Healthcare Bioprocess R&D AB

<120> POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN A INMUNOGLOBULINA MUTADOS

25 <130> 313838A

<160> 95

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 51

<212> PRT

35 <213> Staphylococcus aureus

<400> 1

ES 2 874 974 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

5 <210> 2  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 2  
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

10 Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

15 <210> 3  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 3  
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

20 <210> 4  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 4

ES 2 874 974 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 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

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

<400> 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 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

10 <210> 6  
<211> 58  
<212> PRT  
15 <213> Escherichia coli

<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

20 <210> 7  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

<400> 7

ES 2 874 974 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp 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 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> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 8

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

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

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

10

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

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 9

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

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

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

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

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 10

25

ES 2 874 974 T3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala 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

5 <210> 11  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 11  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

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

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

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

15 <210> 12  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 12  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

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

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

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

20 <210> 13  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

25 <400> 13

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 14

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

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

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

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

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 15

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

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

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

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

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 16

ES 2 874 974 T3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 17

<211> 237

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 17

5

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu  
 35 40 45

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

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

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

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

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 18  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 18

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu  
 35 40 45

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

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

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

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

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 145 150 155 160

Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 19  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 19

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 20  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 20

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile  
 35 40 45

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

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

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

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 21  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 21

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 35 40 45

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

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

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

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

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

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

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 22  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 22

ES 2 874 974 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 Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

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

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 23

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

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

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

10

Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 24

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 24

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

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

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

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

20

<210> 25

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

25

<400> 25

ES 2 874 974 T3

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

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

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 26  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 26  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

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

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

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

<210> 27  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 27  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

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

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

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

<210> 28  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 28

ES 2 874 974 T3

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

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

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

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

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 29

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

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

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

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

<210> 30

<211> 237

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 30

15

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile  
 35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp  
 50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

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

Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Arg  
 100 105 110

Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 31  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 31

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Lys  
 65 70 75 80

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

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

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Arg Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

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

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 32  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 32

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile  
 35 40 45

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

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

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

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 33  
 <211> 353  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 33

ES 2 874 974 T3

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

ES 2 874 974 T3

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys  
 225 230 235 240

Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 245 250 255

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

Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 275 280 285

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln  
 290 295 300

Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln  
 305 310 315 320

Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys  
 325 330 335

Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 340 345 350

Cys

<210> 34

<211> 237

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 34

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 35  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 35

ES 2 874 974 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu  
 115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 130 135 140

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

Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr  
 180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Arg Ala Ile Leu Ala  
 210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
 225 230 235

5 <210> 36  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 36

ES 2 874 974 T3

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

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

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 37

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Gln Glu 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 Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

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

<210> 38

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 38

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 39

ES 2 874 974 T3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 40

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 40

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 41

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 42

ES 2 874 974 T3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 43

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 44

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 44

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

25

<400> 45

ES 2 874 974 T3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 46

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 46

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

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

10

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

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

<210> 47

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 47

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 48

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 48

25

ES 2 874 974 T3

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr 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> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 49

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

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

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

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

<210> 50

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 50

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

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

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

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

<210> 51

<211> 47

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 51

ES 2 874 974 T3

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

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

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

<210> 52

<211> 47

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 52

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

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

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

10

<210> 53

<211> 47

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (20) .. (21)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (24) .. (25)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (29) .. (29)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (34)..(36)  
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (42)..(43)  
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (45)..(45)  
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 53  
 Xaa Gln Xaa Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Xaa Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 1 5 10 15  
  
 Glu Gln Arg Xaa Xaa Phe Ile Xaa Xaa Leu Lys Asp Xaa Pro Ser Xaa  
 20 25 30  
  
 Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ala Glu Ala Lys Xaa Xaa Asn Xaa Ala Gln  
 35 40 45

20 <210> 54  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

25 <400> 54  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu 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 Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

30 <210> 55  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 55  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ser Phe Ile Gln  
 20 25 30  
  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

35 <400> 55  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

ES 2 874 974 T3

<210> 56  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 5  
 <400> 56  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Tyr Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55  
 10  
 <210> 57  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 57  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gln Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55  
 15  
 <210> 58  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 58  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Thr Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55  
 25  
 <210> 59  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 30

ES 2 874 974 T3

<400> 59

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

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

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

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

5

<210> 60

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 60

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

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

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

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

10

<210> 61

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 61

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

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

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

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

20

<210> 62

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

25

<400> 62

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

<210> 63

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 63

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

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

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

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

<210> 64

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 64

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

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

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

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

<210> 65

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 65

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

<210> 66

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 66

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

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

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

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

<210> 67

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 67

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

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

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

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

<210> 68

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

25

<400> 68

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

<210> 69

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 69

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

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

10

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

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

<210> 70

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 70

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu 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 Ala Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

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

<210> 71

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

25

<400> 71

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

<210> 72

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 72

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

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

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

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

<210> 73

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 73

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

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

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

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

<210> 74

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 74

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

<210> 75

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 75

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

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

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

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

<210> 76

<211> 57

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 76

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

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

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

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 77

<211> 57

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 77

ES 2 874 974 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 20 25 30  
  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys  
 35 40 45  
  
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55  
  
 5 <210> 78  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
  
 10 <400> 78  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 20 25 30  
  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys  
 35 40 45  
  
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55  
  
 15 <210> 79  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
  
 <400> 79  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 20 25 30  
  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ile Leu Ala Glu Ala Lys  
 35 40 45  
  
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55  
  
 20 <210> 80  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
  
 25 <400> 80  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Cys

<210> 81

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

Lys Cys

<210> 82

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

15

<400> 82

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys Cys

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

<210> 84

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

15

<400> 84

ES 2 874 974 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys Cys

<210> 85

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 85

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Lys Cys

<210> 86

<211> 109

<212> PRT

<213> Escherichia coli

ES 2 874 974 T3

<400> 86

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 87

<211> 121

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 87

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

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

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Tyr Glu Asp Gly Val Asp  
50 55 60

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

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

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys  
115 120

15

<210> 88

<211> 117

<212> PRT

<213> Escherichia coli

ES 2 874 974 T3

<400> 88

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

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

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

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

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

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

Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys Cys  
 115

5

<210> 89

<211> 55

<212> PRT

10 <213> Escherichia coli

<400> 89

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

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

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

15

<210> 90

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 90

ES 2 874 974 T3

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

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

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

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 50 55

<210> 91

<211> 53

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5

<400> 91

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

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

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

Ala Gln Ala Pro Lys  
 50

<210> 92

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 92

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

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

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 50 55

<210> 93

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 93

ES 2 874 974 T3

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

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

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

5 <210> 94  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <400> 94  
 Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 1 5 10 15

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

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

Pro Lys  
 50

15 <210> 95  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 95  
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

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

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Tyr Glu Asp Gly  
 50 55 60

20

## REIVINDICACIONES

- 1.- Una matriz de separación que comprende al menos 11, tal como al menos 15, 15-21, 17-21 o 18-20 mg/ml de ligandos de unión a Fc unidos covalentemente a un soporte poroso, en la que:
- a) dichos ligandos comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis,
- 5 b) dicho soporte poroso comprende partículas de agarosa reticuladas que tienen una mediana ponderada por volumen del diámetro (d<sub>50,v</sub>) de 56-70 micrómetros, un peso de sólidos secos de 55-80 mg/ml, y un tamaño de poro correspondiente a un valor de Kd de cromatografía de filtración en gel inversa de 0,69-0,85 para dextrano de Pm 110 kDa.
- 10 2.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, en la que dichos multímeros comprenden tetrámeros, pentámeros, hexámeros o heptámeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis, tales como hexámeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis.
- 15 3.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, que tiene una capacidad de unión dinámica de remoción al 10 % para la IgG de al menos 45 mg/ml, tal como al menos 50 o al menos 55 mg/ml a 2,4 min de tiempo de residencia y/o tiene una capacidad de unión dinámica de remoción al 10 % para la IgG de al menos 60 mg/ml, tal como al menos 65, al menos 70 o al menos 75 mg/ml a 6 min de tiempo de residencia.
- 4.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, en la que la capacidad de unión dinámica de remoción al 10 % para la IgG a 2,4 min o 6 min de tiempo de residencia se reduce en menos del 20 % después de una incubación durante 31 h en NaOH acuoso 1,0 M a 22 +/- 2 °C.
- 20 5.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, que tiene una constante de disociación para la IgG2 menor que 0,2 mg/ml, tal como menor que 0,1 mg/ml, en tampón fosfato 20 mM, NaCl 180 mM, pH 7,5.
- 6.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, que tiene una presión máxima de al menos 0,58, tal como al menos 0,60 MPa, cuando se carga a una altura de lecho de 300 +/-10 mm en una columna FineLine™ 35.
- 25 7.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, en la que dichos dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis comprenden mutantes de un dominio de unión a Fc originario de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA), definidos por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:51 o SEQ ID NO:52, en la que al menos el resto asparagina o serina en la posición correspondiente a la posición 11 en SEQ ID NO:4-7 ha sido mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina.
- 30 8.- La matriz de separación de la reivindicación 7, en la que:
- i) el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 11 en SEQ ID NO:4-7 es, o ha sido mutado a un ácido glutámico o una lisina;
- ii) el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 9 en SEQ ID NO:4-7 es una alanina;
- iii) el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 9 en SEQ ID NO:4-7 ha sido deletado;
- 35 iv) el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 40 en SEQ ID NO:4-7 es, o ha sido mutado a una valina;
- v) uno o más de los restos aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 56, 57 o 58 en SEQ ID NO:4-7 han sido deletados.
- 40 9.- La matriz de separación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichos dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis comprenden un polipéptido de unión a Fc que tiene una secuencia de aminoácidos definida por, o que tiene al menos 80 %, o al menos 90, 95 % o 98 % de identidad con SEQ ID NO:53,
- X<sub>1</sub>Q X<sub>2</sub>AFYEILX<sub>3</sub>LP NLTEEQRX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>F IX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>LKDX<sub>8</sub>PSX<sub>9</sub> SX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>LAEAKX<sub>13</sub>  
X<sub>14</sub>NX<sub>15</sub>AQ (SEQ ID NO 53)
- en la que, individualmente entre sí:
- X<sub>1</sub> = A o Q o está deletado
- 45 X<sub>2</sub> = E, K, Y, T, F, L, W, I, M, V, A, H o R
- X<sub>3</sub> = H o K
- X<sub>4</sub> = A o N

X<sub>5</sub> = A, G, S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K

X<sub>6</sub> = Q o E

X<sub>7</sub> = S o K

X<sub>8</sub> = E o D

5 X<sub>9</sub> = Q o V o está delecionado

X<sub>10</sub> = K, R o A o está delecionado

X<sub>11</sub> = A, E o N o está delecionado

X<sub>12</sub> = I o L

X<sub>13</sub> = K o R

10 X<sub>14</sub> = L o Y

X<sub>15</sub> = D, F, Y, W, K o R.

10.- La matriz de separación de la reivindicación 9, en la que, individualmente entre sí:

X<sub>1</sub> = A o está delecionado, X<sub>2</sub> = E, X<sub>3</sub> = H, X<sub>4</sub> = N, X<sub>6</sub> = Q, X<sub>7</sub> = S, X<sub>8</sub> = D, X<sub>9</sub> = V o está delecionado, X<sub>10</sub> = K o está delecionado, X<sub>11</sub> = A o está delecionado, X<sub>12</sub> = I, X<sub>13</sub> = K, X<sub>14</sub> = L.

15 11.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, en la que los polipéptidos están conectados por conectores que comprenden hasta 25 aminoácidos, tal como 3-25 o 3-20 aminoácidos.

20 12.- La matriz de separación de cualquier reivindicación anterior, en la que al menos dos polipéptidos están conectados por conectores que comprenden o que consisten fundamentalmente en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en APKVDAKFDKE, APKVDNKFNKE, APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APK, APKYEDGVDAKFDKE y YEDG.

13.- Un método para aislar una inmunoglobulina, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra líquida que comprende una inmunoglobulina con una matriz de separación según cualquier reivindicación anterior,

25 b) lavar dicha matriz de separación con un líquido de lavado,

c) eluir la inmunoglobulina de la matriz de separación con un líquido de elución, y

d) limpiar la matriz de separación con un líquido de limpieza.

30 14.- El método de la reivindicación 13, en el que el líquido de limpieza comprende NaOH o KOH 0,1-1,0 M, tal como NaOH o KOH 0,4-1,0 M y/o en el que las etapas a)-d) se repiten al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces o 50-200 veces.

**Alineamiento de dominios de unión a Fc**

E	---	-----AQQ	NAFYQVLNMP	NLNADQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANVLGEAQK	LNDQAPK	51	(SEQ	ID NO: 1)
D	ADA	QQNKFNKDOQ	SAFYEILNMP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	STNVLGEAKK	LNESQAPK	61	(SEQ	ID NO: 2)
A	--A	DNN-FNKEQQ	NAFYEILNMP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNESQAPK	58	(SEQ	ID NO: 3)
B	---	ADNKFNKEQQ	NAFYEILHLP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ	ID NO: 4)
C	---	ADNKFNKEQQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNGF	IQSLKDDPSV	SKEILAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ	ID NO: 5)
Z	---	VDNKFNKEQQ	NAFYEILHLP	NLNEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ	ID NO: 6)
Zvar	---	VDAKFDKEQQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ	ID NO: 7)
	---	-----QQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQ---	47	(SEQ	ID NO: 51)
	---	-----QQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNGF	IQSLKDDPSV	SKEILAEAKK	LNDQ---	47	(SEQ	ID NO: 52)
Pos	1	10	20	30	40	50	58			

Fig. 1

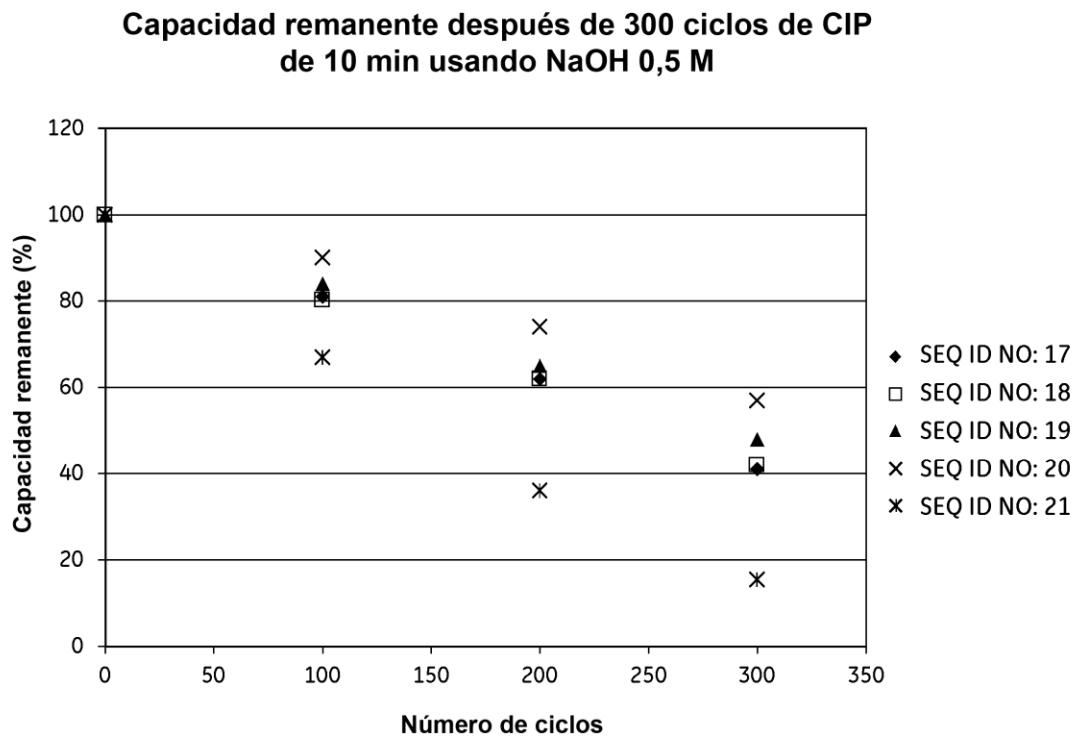


Fig. 2.

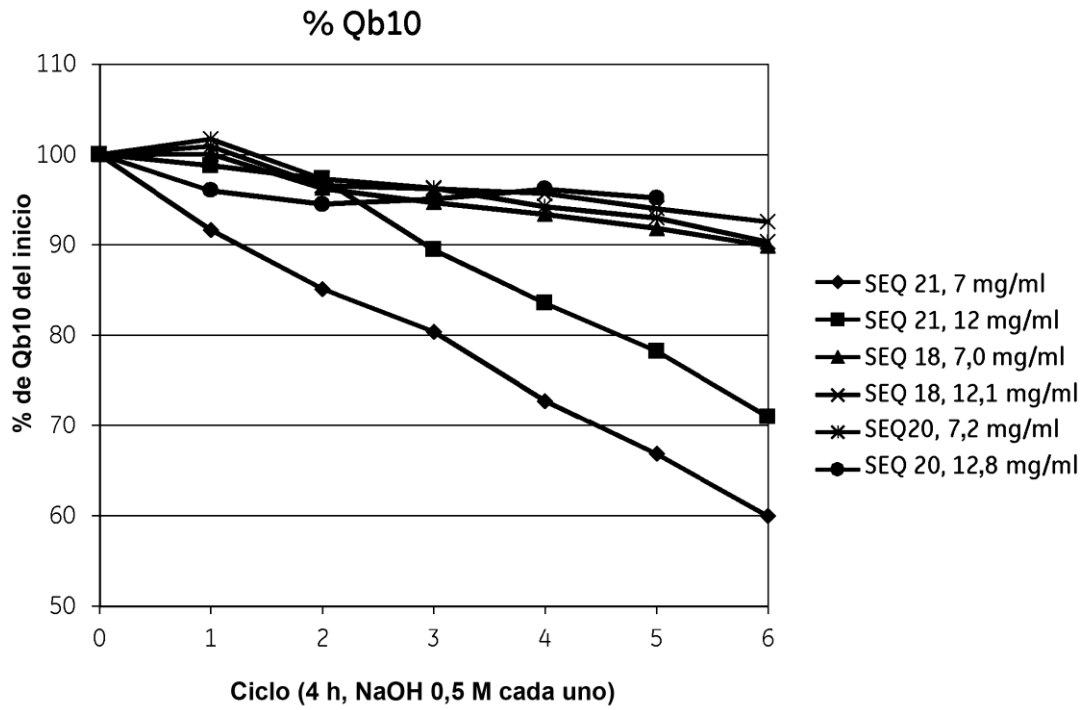


Fig. 3.

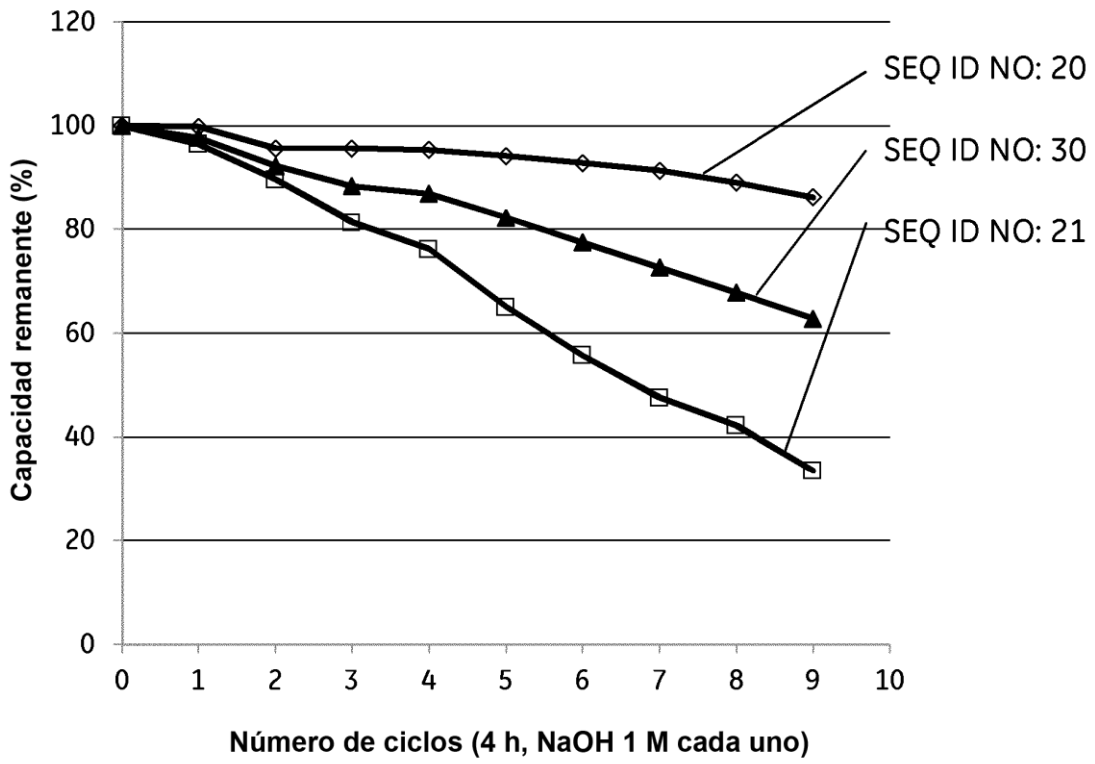


Fig. 4.

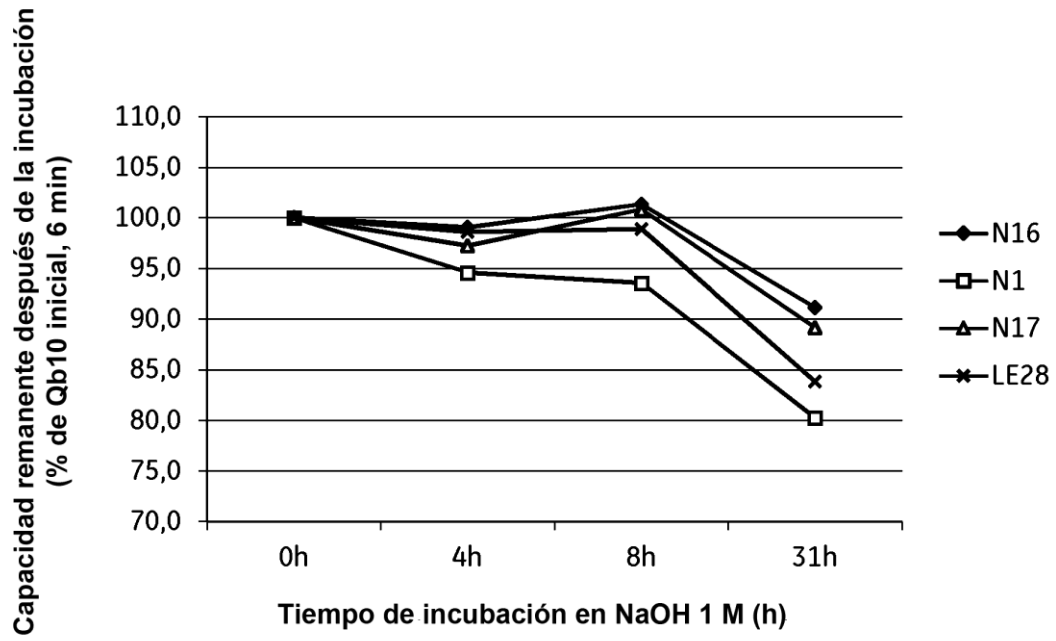


Fig. 5.

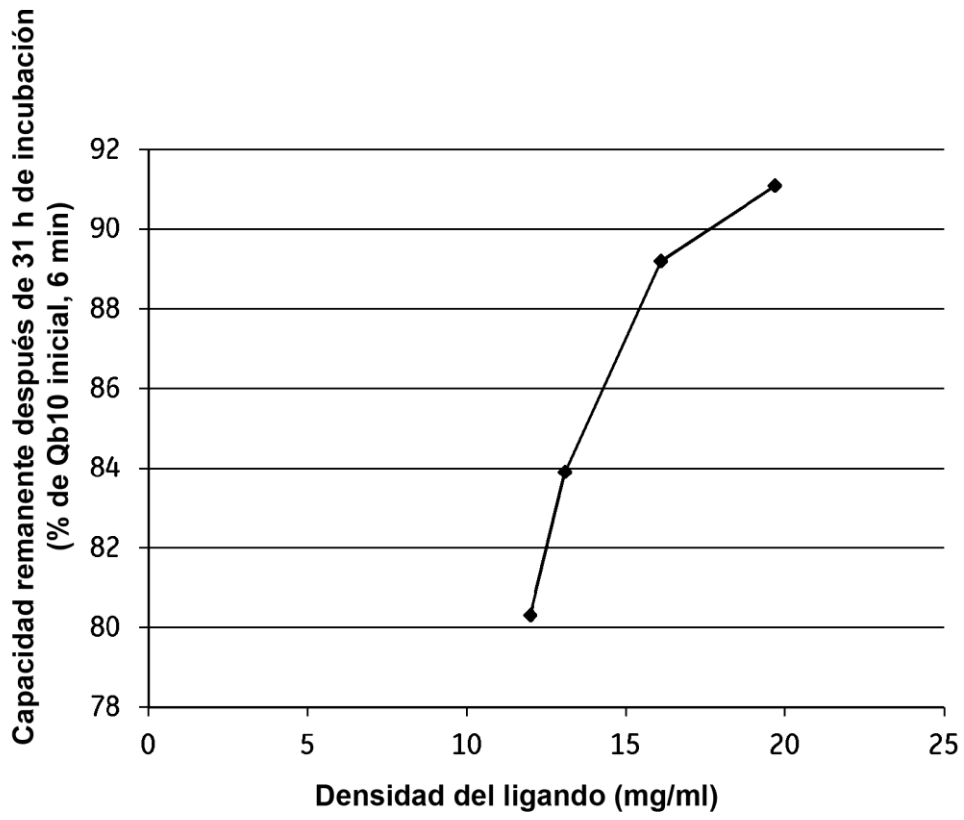


Fig. 6.