

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 234**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2015 E 20185632 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3757123**

54 Título: **Polipéptidos de unión a inmunoglobulina mutados**

30 Prioridad:

17.11.2014 SE 1451376
12.06.2015 GB 201510261
12.06.2015 GB 201510263

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2024

73 Titular/es:

CYTIVA BIOPROCESS R&D AB (100.00%)
Björkgatan 30
751 84 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

RODRIGO, GUSTAV;
ANDER, MATS y
BJORKMAN, TOMAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 234 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

Polipéptidos de unión a inmunoglobulina mutados

Campo técnico de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 Las inmunoglobulinas representan los productos biofarmacéuticos más frecuentes en la fabricación o el desarrollo en todo el mundo. La alta demanda comercial y, por tanto, el valor de este mercado terapéutico particular ha llevado a que las empresas farmacéuticas hagan hincapié en maximizar la productividad de sus respectivos procesos de fabricación de mAb mientras se controlan los costes asociados.

15 La cromatografía de afinidad se utiliza en la mayoría de los casos, 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 afinidad son las proteínas capaces de unirse específicamente a partes invariables de una molécula de inmunoglobulina, siendo dicha interacción independiente de la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Dichos reactivos pueden ser ampliamente utilizados para la recuperación por cromatografía de afinidad de inmunoglobulinas de diferentes muestras tales como, pero no limitadas a, preparaciones de suero o plasma o materias primas derivadas de cultivos celulares. Un ejemplo de dicha proteína es la proteína estafilocócica A, que contiene dominios capaces de unirse a las porciones Fc y Fab de las inmunoglobulinas IgG de diferentes especies. Estos dominios se denominan comúnmente dominios E, D, A, B y C.

20 Los reactivos basados en la proteína estafilocócica A (SpA), debido a su alta afinidad y selectividad, han encontrado un uso generalizado en el campo de la biotecnología, por ejemplo, en cromatografía de afinidad para la captura y purificación de anticuerpos, así como para la detección y cuantificación. En la actualidad, el medio de afinidad basado en SpA es probablemente el medio de afinidad más ampliamente utilizado para el aislamiento de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de diferentes muestras incluyendo sobrenadantes de cultivos celulares industriales. En consecuencia, varias matrices que comprenden ligandos de la proteína A están disponibles comercialmente, por ejemplo, en forma de proteína A nativa (por ejemplo, Protein A SEPHAROSE™, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y también compuestas por proteína A recombinante (por ejemplo, rProtein A-SEPHAROSE™, GE Healthcare). Más específicamente, la manipulación genética realizada en el producto de proteína A recombinante comercial tiene como objetivo facilitar la unión de la misma a un soporte y aumentar la productividad del ligando.

25 Estas aplicaciones, como otras aplicaciones de la cromatografía de afinidad, requieren atención integral para la eliminación definitiva de los contaminantes. Dichos contaminantes pueden ser, por ejemplo, moléculas no eluidas adsorbidas en la fase estacionaria o matriz en un procedimiento cromatográfico, tales como biomoléculas o microorganismos no deseados, incluyendo por ejemplo proteínas, carbohidratos, lípidos, bacterias y virus. La eliminación de dichos contaminantes de la matriz se realiza generalmente después de la primera elución del producto deseado para regenerar la matriz antes del siguiente uso. Dicha eliminación implica normalmente un procedimiento conocido como limpieza in situ (CIP), en donde se utilizan agentes capaces de eluir los contaminantes de la fase estacionaria. Una de dichas clases de agentes utilizadas a menudo son las disoluciones alcalinas que se pasan sobre dicha fase estacionaria. En la actualidad, el agente de limpieza y desinfección más utilizado es el NaOH, y la concentración del mismo puede oscilar entre 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 valores de pH superiores a 13. Para muchas matrices de cromatografía de afinidad que contienen ligandos de afinidad proteínicos, dicho entorno alcalino es una condición muy dura y, en consecuencia, da como resultado capacidades disminuidas debido a la inestabilidad del ligando al pH elevado implicado.

30 Por lo tanto, se ha centrado una extensa investigación en el desarrollo de ligandos de proteínas modificadas genéticamente que muestran una capacidad mejorada para soportar valores de pH alcalinos. Por ejemplo, Gülich *et al.* (Susanne Gülich, Martin Linhult, Per-Ake Nygren, Mathias Uhlén, Sophia Hober, Journal of Biotechnology 80 (2000), 169-178) sugirieron la modificación genética de proteínas para mejorar las propiedades de estabilidad de un dominio de unión a albúmina (ABD) de estreptococos en entornos alcalinos. Gülich *et al.* crearon un mutante de ABD, en el que los cuatro residuos de asparagina han sido reemplazados por leucina (un residuo), aspartato (dos residuos) y lisina (un residuo). Además, Gülich *et al.* reportan 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 genéticamente muestran mayores capacidades de unión después de la exposición repetida a condiciones alcalinas que las columnas preparadas utilizando el ligando parental no modificado. Por lo tanto, se concluye en la presente memoria que los cuatro residuos de asparagina se pueden reemplazar sin ningún efecto significativo sobre la estructura y función.

Un trabajo reciente muestra que también se pueden realizar cambios en la proteína A (SpA) para lograr propiedades similares. La publicación de solicitud de patente estadounidense US 2005/0143566 describe que cuando al menos un residuo de asparagina se muta a un aminoácido distinto de glutamina o ácido aspártico, la mutación confiere un aumento de la estabilidad química a valores de pH de hasta aproximadamente 13-14 en comparación con el SpA parental, tal como el dominio B del SpA, o la proteína Z, un constructo sintético derivado del dominio B del SpA (documento US 5.143.844). Los autores muestran que cuando estas proteínas mutadas se utilizan como ligandos de afinidad, los medios de separación, como se esperaba, pueden resistir mejor los procedimientos de limpieza que utilizan agentes alcalinos. Además, mutaciones de los dominios de la proteína A con el propósito de aumentar la estabilidad alcalina se han publicado en los documentos WO 2008/039141, JP 2006304633A, EP 1992692A1, EP 2202310A2, WO 2010/110288, WO 2012/086660, WO 2012/083425, WO 2012/087230, WO 2014/146350, EP 2728000 A1, WO 03/080655 A1, JP 2010 081866 A, US 5011686, así como en Hober *et al.*: J Chromatogr B, 848(1), 40-47, 2007. Sin embargo, las mutaciones actualmente disponibles siguen siendo sensibles al pH alcalino y la concentración de NaOH durante la limpieza suele limitarse a 0,1 M, lo que significa que es difícil conseguir una limpieza completa. Concentraciones más altas de NaOH, que mejorarían la limpieza, conducen a pérdidas de capacidad inaceptables.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad en este campo de obtener una matriz de separación que contenga ligandos de proteína que tenga una estabilidad mejorada adicional frente a los procedimientos de limpieza alcalina.

Compendio de la invención

Un aspecto de la invención es proporcionar un polipéptido con una estabilidad alcalina mejorada. Esto se logra con un polipéptido como se define en la reivindicación 1.

Una ventaja es que la estabilidad alcalina se mejora con respecto a los polipéptidos parentales, con una unión altamente selectiva mantenida hacia inmunoglobulinas y otras proteínas que contienen Fc.

Un segundo aspecto de la invención es proporcionar un multímero con estabilidad alcalina mejorada, que comprende una pluralidad de polipéptidos. Esto se logra con un multímero como se define en las reivindicaciones.

Un tercer aspecto de la invención es proporcionar un ácido nucleico o un vector que codifica un polipéptido o multímero según cualquier reivindicación anterior, o un sistema de expresión, que comprende dicho ácido nucleico o vector. Esto se logra con un ácido nucleico o vector o sistema de expresión como se define en las reivindicaciones.

Un cuarto aspecto de la invención es proporcionar una matriz de separación capaz de unir selectivamente inmunoglobulinas y otras proteínas que contienen Fc y mostrar una estabilidad alcalina mejorada. Esto se logra con una matriz de separación como se define en las reivindicaciones.

Un quinto aspecto de la invención es proporcionar un método eficaz y económico para aislar una inmunoglobulina u otra proteína que contiene Fc. Esto se logra con un método como se define en las reivindicaciones.

Realizaciones adecuadas adicionales de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Definiciones

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

Los términos "polipéptido de unión a Fc" y "proteína de unión a Fc" significan un polipéptido o proteína respectivamente, capaz de unirse a la parte cristalizable (Fc) de un anticuerpo e incluye, por ejemplo, la Proteína A y la Proteína G, o cualquier fragmento o proteína de fusión de las mismas que haya mantenido dicha propiedad de unión.

El término "enlazador" en la presente memoria significa un elemento que une dos unidades polipeptídicas, monómeros o dominios entre sí en un multímero.

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

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una alineación de los dominios de unión a Fc como se define en SEQ ID NO: 1-7 y 51-52.

La Figura 2 muestra los resultados del Ejemplo 2 para la estabilidad alcalina de las variantes del polipéptido Zvar tetramérico parental y mutado (SEQ ID NO 7) acoplado a un chip biosensor SPR.

La Figura 3 muestra los resultados del Ejemplo 4 para la estabilidad alcalina (NaOH 0,5 M) de las variantes del polipéptido Zvar tetramérico parental y mutado (SEQ ID NO 7) acoplado a perlas de agarosa.

La Figura 4 muestra los resultados del Ejemplo 4 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de las variantes del polipéptido Zvar tetramérico parental y mutado (SEQ ID NO 7) acoplado a perlas de agarosa.

Descripción detallada de las realizaciones

5 En un aspecto la presente invención describe un polipéptido de unión a Fc, que comprende un mutante de un dominio de unión a Fc de la Proteína estafilocócica A (SpA), que tiene al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 7 (Zvar), en donde el residuo de asparagina en la posición* que corresponde a la posición 11 en SEQ ID NO: 7 ha sido mutado a un aminoácido seleccionado de ácido glutámico o lisina. La SEQ ID NO 7 indica una variante mutada de la Proteína Z (SEQ ID NO: 6), denominada en la presente memoria Zvar, con las mutaciones N3A, N6D, N23T. La mutación de N11 confiere una estabilidad alcalina mejorada en comparación con el dominio/polipéptido parental, sin alterar las propiedades de unión a inmunoglobulinas. Por lo tanto, el polipéptido se puede describir también como un polipéptido de unión a Fc- o inmunoglobulina, o alternativamente como una unidad polipeptídica de unión a Fc- o inmunoglobulina.

*A lo largo de esta descripción, se utiliza la convención de numeración de la posición del residuo de aminoácido de la Figura 1, y los números de posición se designan como correspondientes a los de la SEQ ID NO 4-7.

15 La mutación N11 (una mutación N11E o N11K) y la mutación del residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 9 de la SEQ ID NO:7 a alanina puede ser la única mutación o el polipéptido puede comprender también mutaciones adicionales, tales como sustituciones en al menos una de las posiciones que corresponden 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 de la SEQ ID NO: 7. En una o más de estas posiciones, el residuo aminoácido original puede p. ej. ser sustituido por un aminoácido que no sea asparagina, prolina o cisteína. El residuo aminoácido original puede p. ej. ser sustituido con una alanina, una valina, una treonina, una serina, una lisina, un ácido glutámico o un ácido aspártico. Además, uno o más residuos aminoácidos pueden ser eliminados, p. ej. de las posiciones 1-6 y/o de las posiciones 56-58.

20 La combinación de las mutaciones en las posiciones 9 y 11 proporciona una estabilidad alcalina particularmente buena, como se muestra en los ejemplos. Según la presente invención, en SEQ ID NO: 7 el residuo de aminoácido en la posición 9 es una alanina y el residuo de aminoácido en la posición 11 es una lisina o ácido glutámico, por ejemplo, una lisina. Las mutaciones en la posición 9 se describen también en la solicitud de Patente en trámite PCT/SE2014/050872.

25 En algunas realizaciones el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 43 en SEQ ID NO: 7 es una alanina o un ácido glutámico, por ejemplo, una alanina. En realizaciones específicas, los residuos de aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO: 7 son alanina y lisina/ácido glutámico respectivamente, mientras que el residuo de aminoácido en la posición 43 es alanina o ácido glutámico.

30 En algunas realizaciones el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 40 en SEQ ID NO: 7 es valina. En realizaciones específicas, los residuos de aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO: 7 son alanina y ácido glutámico respectivamente, mientras que el residuo de aminoácido en la posición 40 es valina. Opcionalmente, el residuo de aminoácido en la posición 43 puede ser entonces alanina o ácido glutámico.

35 En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 44 en SEQ ID NO: 7 es una leucina o una isoleucina. En realizaciones específicas, los residuos de aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO: 7 son alanina y lisina/ácido glutámico respectivamente, mientras que el residuo de aminoácido en la posición 44 es isoleucina. Opcionalmente, el residuo de aminoácido en la posición 43 puede ser entonces alanina o ácido glutámico.

40 El polipéptido de la presente invención incluye una o más de las mutaciones especificadas anteriormente para las posiciones 43, 40 y 44 de la SEQ ID NO:7. Más específicamente, el residuo aminoácido en la posición 43 es alanina o ácido glutámico; y/o el residuo aminoácido en la posición 40 es valina; y/o el residuo aminoácido en la posición 44 es isoleucina.

45 El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 50 de la SEQ ID NO: 7 puede ser una arginina o un ácido glutámico.

El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 3 de la SEQ ID NO: 7 puede ser una alanina y/o el residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 6 de la SEQ ID NO: 4-7 puede ser un ácido aspártico. Uno de los residuos aminoácidos en las posiciones 3 y 6 puede ser una asparagina y en una alternativa ambos residuos aminoácidos en las posiciones 3 y 6 pueden ser asparaginas.

50 En ciertas realizaciones el residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 28 de la SEQ ID NO: 7 es una alanina o una asparagina, tal como una alanina.

El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 42 de la SEQ ID NO: 7 puede ser una alanina, lisina o arginina. En realizaciones específicas, el residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 42 de la SEQ ID NO: 7 es lisina o arginina.

El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 18 de la SEQ ID NO: 7 puede ser una lisina o una histidina, tal como una lisina.

El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 33 de la SEQ ID NO: 7 puede ser una lisina o una serina, tal como una lisina.

- 5 El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 37 de la SEQ ID NO: 7 puede ser un ácido glutámico o un ácido aspártico, tal como un ácido glutámico.

El residuo aminoácido en la posición correspondiente a la posición 51 de la SEQ ID NO: 7 puede ser una tirosina o una leucina, tal como una tirosina.

- 10 En ciertas realizaciones, la mutación en SEQ ID NO 7, se selecciona del grupo que consiste en: 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; y Q9A, N11K, H18K, S33K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R, L51Y, Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R; Q9A, N11E, D37E, Q40V, A42K, N43A, L44I y Q9A, N11E, D37E, Q40V, A42R, N43A, L44I. Estas mutaciones proporcionan estabilidades alcalinas particularmente altas. La mutación de la SEQ ID NO 7 también se puede seleccionar del grupo
- 15 que consiste en Q9A, N11E, N43A; Q9A, N11E, N28A, N43A; Q9A, N11E, Q40V, A42K, N43E, L44I; Q9A, N11E, Q40V, A42K, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, S33K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R, L51Y; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I y Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R.

- 20 En algunas realizaciones, el polipéptido comprende o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 49 y SEQ ID NO 50. El polipéptido puede, por ejemplo, definirse mediante una secuencia seleccionada de los grupos anteriores o de subgrupos de estos grupos, pero puede comprender también residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N- y/o C-terminal, por ejemplo, una secuencia líder en el extremo N-terminal y/o una secuencia de cola en el extremo C-terminal.

SEQ ID NO 8 Zvar(Q9A, N11E, N43A)

- 25 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 9 Zvar(Q9A, N11E, N28A, N43A)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 10 Zvar(Q9A, N11E, Q40V, A42K, N43E, L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

- 30 SEQ ID NO 11 Zvar(Q9A, N11E, Q40V, A42K, N43A, L44I)

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 12 Zvar(N11E, Q32A) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IASLKDDPSQ SANLLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 13 Zvar(N11E) (no es parte de la invención)

- 35 VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 14 Zvar(N11E, Q32E, Q40E) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSE SANLLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 15 Zvar(N11E, Q32E, K50R) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSQ SANLLAEAKR
LNDQAQPK

SEQ ID NO 16 Zvar(N11K) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ KAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 23 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) (no es parte de la invención)

5 VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKDKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDQAQPK

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

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

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

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRAAF IQKDKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDQAQPK

10 SEQ ID NO 26 Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK
LNDQAQPK

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

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK
LNDQAQPK

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

15 VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKR
LNDQAQPK

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

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK
LNDQAQPK

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

ADNKFNKEAQ EAFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

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

ADNKFNKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 38 Zvar(N11Y) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ YAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 39 Zvar(N11T) (no es parte de la invención)

25 VDAKFDKEQQ TAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 40 Zvar(N11F) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ FAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 41 Zvar(N11L) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ LAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 42 Zvar(N11W) (no es parte de la invención)

5 VDAKFDKEQQ WAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 43 Zvar(N11I) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ IAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 44 Zvar(N11M) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ MAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

10 SEQ ID NO 45 Zvar(N11V) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ VAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 46 Zvar(N11A) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ AAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 47 Zvar(N11H) (no es parte de la invención)

15 VDAKFDKEQQ HAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 48 Zvar(N11R) (no es parte de la invención)

VDAKFDKEQQ RAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

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

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

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

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRAILAEAKK
LNDQAQPK

25 En un segundo aspecto la presente invención describe un multímero que comprende, o consiste esencialmente en, una pluralidad de unidades polipeptídicas como se define por una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. El multímero puede, por ejemplo, ser un dímero, un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero o un nonámero. Puede ser un homomultímero, donde todas las unidades en el multímero son idénticas o puede ser un heteromultímero, donde al menos una unidad difiere de las otras. Ventajosamente, todas las unidades en el multímero son estables a los álcalis, por ejemplo, comprendiendo las mutaciones descritas anteriormente. Los polipéptidos se pueden unir unos con otros directamente mediante enlaces peptídicos entre los extremos C-terminal y N-terminal de los polipéptidos. Alternativamente, dos o más unidades en el multímero se pueden unir mediante enlazadores que comprenden especies oligoméricas o poliméricas, tales como elementos que comprenden hasta 15 o 30 aminoácidos, por ejemplo, 1-5, 1-10 o 5-10 aminoácidos. La naturaleza de dicho enlazador
30 preferiblemente no debería desestabilizar la conformación espacial de las unidades de proteínas. Esto puede lograrse,

por ejemplo, evitando la presencia de prolina en los enlazadores. Además, dicho enlazador debería ser preferiblemente también suficientemente estable en entornos alcalinos para no perjudicar las propiedades de las unidades de proteína mutadas. Para este fin, es ventajoso si los enlazadores no contienen asparagina. Puede ser adicionalmente ventajoso si los enlazadores no contienen glutamina. El multímero puede comprender además en el extremo N-terminal una pluralidad de residuos de aminoácidos, por ejemplo, que se originan en el proceso de clonación o que constituyen un residuo de una secuencia de señalización eliminada. El número de residuos de aminoácidos adicionales puede ser, por ejemplo, 15 o menos, por ejemplo 10 o menos o 5 o menos. Como un ejemplo específico, el multímero puede comprender una secuencia AQ en el extremo N-terminal.

5 En ciertas realizaciones, el multímero puede comprender, o consistir esencialmente en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34 y SEQ ID NO 35. Estas secuencias se enumeran a continuación y se denominan Padre(Mutaciones)_n, donde n es el número de unidades de monómero en un multímero.

SEQ ID NO 17 Zvar(Q9A,N11E,N43A)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SAALLAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LND AQAPKC

15 SEQ ID NO 18 Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ
SAALLAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF
IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRAAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LND AQAPKC

SEQ ID NO 19 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKEILAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LND AQAPKC

SEQ ID NO 20 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4

20 AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKAILAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LND AQAPKC

SEQ ID NO 30 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4 (no es parte de la invención)

AQGT VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKDKDEPSQ SRILAEAKR
YND AQAPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKDKDEPSQ
SRILAEAKR YND AQAPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF
IQKDKDEPSQ SRILAEAKR YND AQAPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP
NLTEEQRNAF IQKDKDEPSQ SRILAEAKR YND AQAPKC

SEQ ID NO 31 Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)4 (no es parte de la invención)

25 AQGT VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK
LND AQAPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ
SRNLLAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF
IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK LND AQAPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP
NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK LND AQAPKC

SEQ ID NO 32 Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV
 SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRAAF
 IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRAAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 33 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
 SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
 IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ
 EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPKC

SEQ ID NO 34 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV
 SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
 IQSLKDEPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK LNDQAQPKC

5

SEQ ID NO 35 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV
 SRAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
 IQSLKDEPSV SRAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRAILAEAKK LNDQAQPKC

En algunas realizaciones, el polipéptido y/o multímero, 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 residuos de cisteína, una pluralidad de residuos de lisina y una pluralidad de residuos de histidina. El/los elemento(s) de acoplamiento también se pueden localizar dentro de 1-5 residuos de aminoácidos, por ejemplo, dentro de 1-3 o 1-2 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal o N-terminal. El elemento de acoplamiento puede ser, por ejemplo, una única cisteína en el extremo C-terminal. El/los elemento(s) de acoplamiento puede unirse directamente al extremo C- o N-terminal, o él/ellos pueden unirse mediante una extensión que comprende hasta 15 aminoácidos, por ejemplo, 1-5, 1-10 o 5-10 aminoácidos. Esta extensión sería preferiblemente también suficientemente estable en entornos alcalinos para no perjudicar las propiedades de la proteína mutada. Para este fin, es ventajoso si la extensión no contiene asparagina. Adicionalmente puede ser ventajoso si la extensión no contiene glutamina. Una ventaja de tener una cisteína C-terminal es que el acoplamiento del punto final de la proteína se puede lograr mediante la reacción del tiol de la cisteína con un grupo electrófilo sobre un soporte. Esto proporciona una excelente movilidad de la proteína acoplada que es importante para la capacidad de unión.

10

15

20

La estabilidad alcalina del polipéptido o multímero se puede evaluar acoplándolo a un chip SPR, por ejemplo, a los chips de un sensor Biacore CM5 como se describe en los ejemplos, utilizando, por ejemplo, las químicas de acoplamiento de NHS- o maleimida, y midiendo la capacidad de unión de inmunoglobulina del chip, utilizando normalmente IgG policlonal humana, antes y después de la incubación en disoluciones alcalinas a una temperatura especificada, por ejemplo, 22 +/- 2°C. La incubación puede realizarse, por ejemplo, en NaOH 0,5 M para un número 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, por ejemplo, al menos 60, al menos 80 o al menos 90% de la capacidad de la IgG antes de la incubación. Alternativamente, la capacidad de la IgG restante después de 100 ciclos para un mutante particular medido como anteriormente se puede comparar con la capacidad de la IgG restante para el polipéptido/multímero parental. En este caso, la capacidad de la IgG restante para el mutante puede ser al menos 105%, por ejemplo, al menos 110%, al menos 125%, al menos 150% o al menos 200% de la del polipéptido/multímero parental.

25

30

En un tercer aspecto la presente invención describe un ácido nucleico que codifica un polipéptido o un multímero según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. Por tanto, la invención abarca todas las formas de la secuencia de ácido nucleico presente tales como el RNA y el DNA que codifica el polipéptido o multímero. La

35

invención abarca un vector, tal como un plásmido, que además de la secuencia codificante comprende las secuencias de señal requeridas para la expresión del polipéptido o multímero según la invención. En una realización, el vector comprende un ácido nucleico que codifica un multímero según la invención, en donde los ácidos nucleicos separados que codifican cada unidad pueden tener secuencias de DNA homólogas o heterólogas.

5 Alternativamente, según el tercer aspecto la presente invención describe un sistema de expresión, que comprende, un ácido nucleico o un vector como se describe anteriormente. El sistema de expresión puede ser, por ejemplo, un sistema de células huésped procariotas gram-positivas o gram-negativas, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus sp.* que ha sido modificado para expresar el presente polipéptido o multímero. En una realización alternativa, el sistema de expresión es un sistema de células huésped eucariota, como una levadura, por ejemplo, *Pichia pastoris* o
10 *Saccharomyces cerevisiae*, o células mamíferas, por ejemplo, células CHO.

En un cuarto aspecto, la presente invención describe una matriz de separación, en donde una pluralidad de polipéptidos o multímeros según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente se ha acoplado a un soporte sólido. Dicha matriz es útil para la separación de inmunoglobulinas u otras proteínas que contienen Fc y, debido a la estabilidad alcalina mejorada de los polipéptidos/multímeros, la matriz resistirá condiciones altamente alcalinas durante la limpieza, lo cual es esencial para el uso repetido a largo plazo en un ajuste de separación de bioprocesos. La estabilidad alcalina de la matriz se puede evaluar midiendo la capacidad de unión a inmunoglobulina, utilizando normalmente IgG humana policlonal, antes y después de la 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, por ejemplo, 100, 200 o 300 ciclos, que corresponde a un tiempo de incubación total de 25, 50 o 75 horas. La capacidad de la IgG de la matriz después de 96-100 ciclos de incubación de 15 min o un tiempo de incubación total de 24 o 25 horas en NaOH 0,5 M a 22 +/- 2°C puede ser al menos 80, por ejemplo, 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 de incubación total de 24 horas en NaOH 1,0 M a 22 +/- 2°C puede ser al menos 70, por ejemplo, al menos 80 o al menos 90% de la capacidad de la IgG antes de la incubación.

25 Como comprenderá el experto, el polipéptido o multímero expresado debería purificarse en un grado apropiado antes de inmovilizarse en un soporte. Dichos métodos de purificación son bien conocidos en el campo y la inmovilización de ligandos basados en proteínas en soportes se lleva a cabo fácilmente utilizando métodos estándar. Los métodos y soportes adecuados se analizarán a continuación con más detalle.

El soporte sólido de la matriz según la invención puede ser de cualquier tipo adecuado bien conocido. Una matriz de separación por afinidad convencional es a menudo de naturaleza orgánica y se basa en polímeros que exponen una superficie hidrófila al medio acuoso utilizado, es decir, exponen grupos hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), carboxamido (-CONH₂, posiblemente en formas N-sustituidas), amino (-NH₂, posiblemente en formas sustituidas), oligo- o polietilenoxi en sus superficies externas y, si están presentes, también en las internas. El soporte sólido puede ser adecuadamente poroso. La porosidad puede expresarse como un valor de Kav o Kd (la fracción de volumen de poro disponible para una molécula de sonda de un tamaño particular) medido mediante cromatografía de exclusión por tamaño inverso, por ejemplo, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, págs. 6-13. Por definición, tanto los valores de Kd como Kav siempre se encuentran dentro del rango de 0 – 1. El valor de Kav puede ser ventajosamente 0,6 – 0,95, por ejemplo, 0,7 – 0,90 o 0,6 – 0,8, medido con dextrano de peso molecular 110 kDa como una molécula sonda. Una ventaja de esto es que el soporte tiene una gran fracción de poros capaces de acomodar tanto los polipéptidos/multímeros de la invención como las inmunoglobulinas que se unen a los polipéptidos/multímeros y proporcionar transporte masivo de inmunoglobulinas hacia y desde los sitios de unión.

Los polipéptidos o multímeros puede unirse al soporte mediante técnicas de acoplamiento convencionales utilizando, por ejemplo, grupos tiol, amino y/o carboxilo presentes en el ligando. Bisepóxidos, epiclorhidrina, CNBr, N-hidroxisuccinimida (NHS) etc son agentes de acoplamiento bien conocidos. Entre el soporte y el polipéptido/multímero se puede introducir una molécula conocida como espaciador, que mejora la disponibilidad del polipéptido/multímero y facilita el acoplamiento químico del polipéptido/multímero al soporte. Dependiendo de la naturaleza del polipéptido/multímero y las condiciones de acoplamiento, el acoplamiento puede ser un acoplamiento multipunto (por ejemplo, mediante una pluralidad de lisinas) o un acoplamiento de un solo punto (por ejemplo, mediante una sola cisteína). Alternativamente, el polipéptido/multímero puede unirse al soporte mediante un enlace no covalente, tal como adsorción física o adsorción bioespecífica.

En algunas realizaciones la matriz comprende 5 – 25, tal como 5 – 20 mg/ml, 5 – 15 mg/ml, 5 – 11 mg/ml o 6 – 11 mg/ml del polipéptido o multímero acoplado al soporte. La cantidad de polipéptido/multímero acoplado se puede controlar mediante la concentración de polipéptido/multímero utilizado en el proceso de acoplamiento, mediante las condiciones de activación y acoplamiento utilizadas y/o por la estructura porosa del soporte utilizado. 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 que los poros se estrechan significativamente por el polipéptido/multímero acoplado. La capacidad de unión relativa por mg de polipéptido/multímero acoplado disminuirá a niveles altos de acoplamiento, dando como resultado un óptimo de costo-beneficio dentro de los rangos especificados anteriormente.

60

En ciertas realizaciones los polipéptidos o multímeros se acoplan al soporte mediante enlaces tioéter. Los métodos para realizar dicho acoplamiento son bien conocidos en este campo y fácilmente realizables por el experto en este campo utilizando técnicas y equipos estándar. Los enlaces tioéter son flexibles y estables y normalmente adecuados para su uso en cromatografía de afinidad. En particular cuando el enlace tioéter es mediante un residuo de cisteína terminal o casi terminal en el polipéptido o multímero, la movilidad del polipéptido/multímero acoplado aumenta, lo que proporciona una capacidad de unión y una cinética de unión mejoradas. En algunas realizaciones, el polipéptido/multímero se acopla mediante una cisteína C-terminal proporcionada en la proteína como se describió anteriormente. Esto permite un acoplamiento eficaz del tiol de la cisteína a grupos electrofílicos, por ejemplo, grupos epóxido, grupos halohidrina, etc. sobre un soporte, dando como resultado un acoplamiento de puente tioéter.

- 5
- 10 En ciertas realizaciones el soporte comprende un polímero polihidroxiilo, tal como un polisacárido. Ejemplos de polisacáridos incluyen, por ejemplo, dextrano, almidón, celulosa, pululano, agar, agarosa, etc. Los polisacáridos son inherentemente hidrófilos con bajos grados de interacciones inespecíficas, proporcionan un alto contenido de grupos hidroxilo reactivos (activables) y generalmente son estables frente a las disoluciones de limpieza alcalinas utilizadas en el bioprocesamiento.
- 15 En algunas realizaciones el soporte comprende agar o agarosa. Los soportes utilizados en la presente invención se pueden preparar fácilmente según métodos estándar, tales como gelificación en suspensión inversa (S Hjertén: Biochim Biophys Acta 79 (2), 393-398 (1964)). Alternativamente, las matrices base son productos comercialmente disponibles, tal como las perlas de agarosa reticuladas vendidas bajo el nombre de SEPHAROSE™ FF (GE Healthcare). En una realización, que es especialmente ventajosa para las separaciones a gran escala, el soporte se ha adaptado para aumentar su rigidez utilizando los métodos descritos en los documentos de Patente US6602990 o US7396467 y por lo tanto hacen que la matriz sea más adecuada para caudales altos.
- 20

En ciertas realizaciones el soporte, tal como un soporte de polisacárido o agarosa, está reticulado, como por ejemplo con reticulaciones de hidroxialquil éter. Los reactivos reticulantes que producen dichas reticulaciones pueden ser, por ejemplo, epihalohidrinias como epiclorhidrina, diepóxidos como butanodiol diglicidil éter, reactivos alilantes como el haluro de alilo o el alil glicidil éter. La reticulación es beneficiosa para la rigidez del soporte y mejora la estabilidad química. Las reticulaciones de hidroxialquil éter son estables a los álcalis y no provocan una adsorción inespecífica significativa.

- 25
- 30 Alternativamente, el soporte sólido se basa en polímeros sintéticos, tales como alcohol polivinílico, acrilatos de polihidroxialquilo, metacrilatos de polihidroxialquilo, poliacrilamidas, polimetacrilamidas, etc. En caso de polímeros hidrófobos, tales como matrices basadas en bencenos divinil y monovinil sustituidos, la superficie de la matriz se hidrofilita a menudo para exponer los grupos hidrófilos como se definió anteriormente a un líquido acuoso circundante. Dichos polímeros se producen fácilmente según métodos estándar, véase, por ejemplo, "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)). Alternativamente, se utiliza un producto comercialmente disponible, tal como SOURCE™ (GE Healthcare). En otra alternativa, el soporte sólido según la invención comprende un soporte de naturaleza inorgánica, por ejemplo, sílice, óxido de circonio, etc.
- 35

En otra realización más, el soporte sólido tiene otra forma, como una superficie, un chip, capilares, o un filtro (por ejemplo, una membrana o una matriz de filtro de profundidad).

- 40 En cuanto a la forma de la matriz según la invención, en una realización la matriz está en la forma de un monolito poroso. En una realización alternativa, la matriz está en forma de perlas o partículas que pueden ser porosas o no porosas. Las matrices en forma de perlas o partículas se pueden utilizar como lecho empacado o en forma suspendida. Las formas suspendidas incluyen las conocidas como lechos expandidos y suspensiones puras, en las que las partículas o perlas pueden moverse libremente. En el caso de monolitos, lechos empacados y lechos expandidos, el procedimiento de separación sigue comúnmente la cromatografía convencional con un gradiente de concentración.
- 45 En caso de la suspensión pura, se utilizará el modo por lotes.

En un quinto aspecto, la presente invención describe un método para aislar una inmunoglobulina, en donde se utiliza una matriz de separación como se describió anteriormente.

En ciertas realizaciones, el método comprende las etapas de:

- 50 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 desde la matriz de separación con un líquido de elución, y
- d) limpiar la matriz de separación con un líquido de limpieza, que puede llamarse alternativamente líquido de limpieza in situ (CIP), por ejemplo, con un tiempo de contacto (incubación) de al menos 10 min.

55

El método puede comprender también las etapas de, antes de la etapa a), proporcionar una matriz de separación por afinidad según una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente y proporcionar una disolución que comprenda una inmunoglobulina y al menos otra sustancia como una muestra líquida y de, después de la etapa c), recuperar el eluido y opcionalmente someter el eluido a etapas de separación adicionales, por ejemplo, mediante una 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 bien conocidas en la técnica de la cromatografía de afinidad y en particular en la técnica de cromatografía de la Proteína A. La muestra líquida que comprende una proteína que contiene Fc y al menos otra sustancia puede comprender proteínas de células huésped (HCP), tales como células CHO, *E Coli* o proteínas de levadura. Los contenidos de células CHO y de proteínas de *E Coli* se pueden determinar convenientemente mediante inmunoensayos dirigidos hacia estas proteínas, por ejemplo, los kits de ELISA CHO HCP o E Coli HCP de Cygnus Technologies. Las proteínas de células huésped o proteínas de células CHO/E Coli se pueden desorber durante la etapa b).

La elución se puede realizar utilizando cualquier disolución adecuada utilizada para la elución del 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. Puede ser también en algunos casos 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 del tampón de elución comprende al menos un ácido carboxílico mono- di- o trifuncional o una sal de dicho ácido carboxílico. En ciertas realizaciones el tampón de elución o el gradiente del 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, por ejemplo, con un pH de 13 – 14. Dichas disoluciones proporcionan una limpieza eficaz 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, por ejemplo, NaOH o KOH 0,5-2,0 o 0,5-1,0 M. Estas son disoluciones de limpieza eficientes, y en particular cuando la concentración de NaOH o KOH es superior a 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 puede incluir también una etapa de desinfección de la matriz con un líquido de desinfección, que puede comprender, por ejemplo, un peróxido, tal como peróxido de hidrógeno y/o un perácido, tal como ácido peracético o ácido perfórmico.

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

Las etapas a) – c) pueden repetirse también al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 50 veces, 50 – 200, 50 – 300 o 50 – 500 veces, realizándose la etapa d) después de una pluralidad de ejemplos de la etapa c), de modo que la etapa d) se realiza al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 50 veces. La etapa d) se puede realizar, por ejemplo, desde cada segundo hasta el vigésimo ejemplo de la etapa c).

Ejemplos

Mutagénesis de proteína

La mutagénesis dirigida al sitio se realizó mediante una PCR de dos etapas utilizando oligonucleótidos que codifican las mutaciones. Como plantilla se utilizó un plásmido que contiene un único dominio de Z, B o C. Los fragmentos de PCR se ligaron en un vector de expresión de *E. Coli*. Se utilizó secuenciación de DNA para verificar la secuencia correcta de los fragmentos insertados.

Para formar multímeros de mutantes se utilizó un sitio Acc I localizado en los codones de inicio (GTA GAC) del dominio B, C o Z, que corresponde a los aminoácidos VD. El vector para el dominio monomérico se digirió con Acc I y trató con fosfatasa. Se diseñaron cebadores de extremos pegajosos Acc I, específicos para cada variante, y se generaron dos productos de PCR superpuestos de cada plantilla. Los productos de PCR se purificaron y la concentración se estimó por comparación de los productos de PCR sobre gel de agarosa al 2%. Se hibridaron cantidades iguales de los productos de PCR por parejas (90°C → 25°C en 45 minutos) en tampón de ligación. El producto resultante consiste aproximadamente en ¼ de fragmentos que probablemente se ligarán en un sitio Acc I (fragmentos de PCR correctos y/o el vector digerido). Después de la ligación y la transformación, las colonias se cribaron por PCR para identificar los constructos que contienen el mutante deseado. Los clones positivos se verificaron mediante secuenciación de DNA.

Expresión del constructo y purificación

Los constructos se expresaron en el periplasma bacteriano mediante fermentación de *E. Coli* K12 en medio estándar. Después de la fermentación las células se trataron térmicamente para liberar el contenido de periplasma en el medio. Los constructos liberados en el medio se recuperaron por microfiltración con una membrana que tiene un tamaño de poro de 0,2 µm.

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

5 El conjunto de elución se ajustó a un pH neutro (pH 8) y se redujo mediante la adición de ditiotretitol. La muestra se cargó después en un intercambiador aniónico. Después de la etapa de lavado el constructo se eluyó en un gradiente de NaCl para separarlo de cualquier contaminante. El conjunto de elución se concentró mediante ultrafiltración a 40-50 mg/ml. Cabe señalar que la purificación por afinidad satisfactoria de un constructo en un medio de IgG inmovilizada indica que el constructo en cuestión tiene una alta afinidad por la IgG.

10 Los ligandos purificados se analizaron con RPC LC-MS para determinar la pureza y comprobar que el peso molecular correspondía al esperado (basado en la secuencia de aminoácidos).

Ejemplo 1

15 Los ligandos monoméricos purificados listados en la Tabla 1, que comprenden además una secuencia líder AAGT en el extremo N-terminal y una cisteína en el extremo C-terminal, se inmovilizaron en los chips de sensor Biacore CM5 (GE Healthcare, Sweden), utilizando el kit de acoplamiento de amina de GE Helathcare (para el acoplamiento de carbodiimidias de aminas en los grupos carboximetilo en el chip) en una cantidad suficiente para dar una intensidad de señal de aproximadamente 200-1500 RU en un instrumento de resonancia de plasmón superficial Biacore (SPR) (GE Healthcare, Sweden). Para seguir la capacidad de unión de IgG de la superficie inmovilizada, se hizo fluir 1 mg/ml de IgG policlonal humana (Gammanorm) sobre el chip y se anotó la intensidad de la señal (proporcional a la cantidad de unión). A continuación, la superficie se sometió a una limpieza in situ (CIP), es decir, se lavó abundantemente con NaOH 500 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 2°C). Esto se repitió durante 96-100 ciclos y la estabilidad alcalina del ligando inmovilizado se siguió como la capacidad de unión de la IgG restante (intensidad de señal) después de cada ciclo. Los resultados se muestran en la Tabla 1 e indican que al menos los ligandos Zvar(N11K)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11E)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11Y)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11T)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11F)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11L)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11W)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11I)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11M)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11V)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11A)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11H)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11R)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11E,Q32A)1 (no es parte de la invención), Zvar(N11E,Q32E,Q40E)1 (no es parte de la invención) and Zvar(N11E,Q32E,K50R)1 (no es parte de la invención), 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 (no es parte de la invención), Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1, Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I) 1 (no es parte de la invención), Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1 y Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)1 tienen una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura Zvar1 parental, utilizada como referencia. Además, los ligandos B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 (no es parte de la invención) y C(Q9A,N11E,E43A)1 (no es parte de la invención) tienen una estabilidad mejorada en comparación con los dominios B y C parentales, utilizados como referencia.

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

Ligando	Secuencia	Capacidad después de 96-100 ciclos	Capacidad de referencia después de 96-100 ciclos	Capacidad relativa a la referencia
Zvar(N11E, Q32A)1 (no es parte de la invención)	SEQ ID NO 12	57%	55%	1,036
Zvar(N11E)1 (no es parte de la invención)	SEQ ID NO 13	59%	55%	1,073
Zvar(N11E, Q32E, Q40E)1 (no es parte de la invención)	SEQ ID NO 14	52%	51%	1,020
Zvar(N11E, Q32E, K50R)1 (no es parte de la invención)	SEQ ID NO 15	53%	51%	1,039
Zvar(N11K)1 (no es parte de la invención)	SEQ ID NO 16	62%	49%	1,270
Zvar(N11Y)1 (no es parte de la invención)	SEQ ID	55%	46%	1,20

ES 2 993 234 T3

	NO 38			
Zvar(N11T)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 39	50%	46%	1,09
Zvar(N11F)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 40	55%	46%	1,20
Zvar(N11L)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 41	57%	47%	1,21
Zvar(N11W)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 42	57%	47%	1,21
Zvar(N11I)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 43	57%	47%	1,21
Zvar(N11M)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 44	58%	46%	1,26
Zvar(N11V)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 45	56%	46%	1,22
Zvar(N11A)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 46	58%	46%	1,26
Zvar(N11H)1(no es parte de la invención)	SEQ ID NO 47	57%	46%	1,24
Zvar(N11R)1(no es parte de la invención)	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(no es parte de la invención)	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(no es parte de la invención)	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
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

Ejemplo 2

Los ligandos tetraméricos y hexaméricos purificados indicados en la Tabla 2 se inmovilizaron en los chips de sensor Biacore CM5 (GE Healthcare, Sweden), utilizando el kit de acoplamiento de amina de GE Healthcare (para el acoplamiento de carbodiimidas de aminas en los grupos carboximetilo en el chip) en una cantidad suficiente para dar una intensidad de señal de aproximadamente 200-1500 RU en un instrumento Biacore (GE Healthcare, Sweden). Para seguir la capacidad de unión de la IgG de la superficie inmovilizada, se hizo fluir 1mg/ml de la IgG policlonal humana (Gammanorm) sobre el chip y se anotó la intensidad de la señal (proporcional a la cantidad de unión). A continuación, la superficie sometió a una limpieza in situ (CIP), es decir, se lavó abundantemente con NaOH 500 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 2°C). Esto se repitió durante 300 ciclos y la estabilidad alcalina del ligando inmovilizado se siguió como la capacidad de unión de la IgG restante (intensidad de 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, Zvar(Q9A, N11E, D37E, Q40V, A42K, N43A, L44I)4 y Zvar(Q9A, N11E, D37E, Q40V, A42R, N43A, L44I)4 tienen una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura de Zvar4 parental, que se utilizó como referencia. El ligando hexamérico Zvar(Q9A, N11E, Q40V, A42K, N43A, L44I)6 tiene también una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura Zvar6 parental, utilizada como referencia.

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

Ligando	SEQ ID NO:	Capacidad restante 100 ciclos (%)	Capacidad relativa a ref. 100 ciclos	Capacidad restante 200 ciclos (%)	Capacidad relativa a ref. 200 ciclos	Capacidad restante 300 ciclos (%)	Capacidad relativa a 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

Ejemplo 3

El Ejemplo 2 se repitió con 100 ciclos CIP de tres ligandos utilizando NaOH 1 M en vez de 500 mM como en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y muestran que los tres ligandos tienen una estabilidad alcalina mejorada también en NaOH 1 M, en comparación con la estructura Zvar4 parental que se utilizó como referencia.

5

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

Ligando	Secuencia	Capacidad restante 100 ciclos (%)	Capacidad relativa a 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

Los ligandos tetraméricos de la Tabla 2 (todos con una cisteína N-terminal adicional) se inmovilizaron sobre perlas de agarosa utilizando los métodos descritos a continuación y evaluados para la capacidad y estabilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y la Figura 3.

10

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

Ligando	SEQ ID NO.	Contenido de ligando (mg/ml)	Capacidad de IgG inicial Qb10 (mg/ml)	Capacidad de IgG restante Qb10 después de 6 ciclos de 4h (mg/ml)	Capacidad de IgG restante después de 6 ciclos de 4h (%)	Retención de la capacidad relativa a ref. después de 6 ciclos de 4h
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

La matriz base utilizada fueron perlas de agarosa reticuladas rígidas de 85 micrómetros de diámetro medio (ponderado en volumen, d50V), preparadas según los métodos del documento de Patente US6602990 y con un tamaño de poro correspondiente a un valor de Kav de cromatografía de filtración en gel inversa de 0,70 para el dextrano de peso molecular 110 kDa, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB

15

Biotechnology 1991, págs. 6-13.

Se mezclaron 25 mL (g) de matriz base 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 epiclorhidrina y la reacción progresó durante 2 horas. El gel activado se lavó con 10 volúmenes de sedimento de gel (GV) de agua.

5 Acoplamiento

A 20 mL de disolución de ligando (50 mg/mL) en un tubo Falcon de 50 ml se añadieron 169 mg de NaHCO₃, 21 mg de Na₂CO₃, 175 mg de NaCl y 7 mg de EDTA. El tubo Falcon se colocó en una mesa giratoria durante 5-10 minutos, y después se añadieron 77 mg de DTE. La reducción prosiguió durante > 45 minutos. La disolución de ligando se desaló, después, en una columna PD10 empaquetada con Sephadex G-25. El contenido de ligando en la disolución desalada se determinó midiendo la absorción de UV a 276 nm.

El gel activado se lavó con 3-5 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM pH 8,6} y después el ligando se acoplo según el método descrito en el documento de Patente US6399750. Todos los tampones utilizados en los experimentos se habían desgasificado con gas nitrógeno durante al menos 5-10 minutos. El contenido de ligando de los geles se podía controlar variando la cantidad y la concentración de la disolución de ligando.

15 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 y después 8-10xGV con agua destilada. Las muestras de gel se enviaron a un laboratorio externo para el análisis de aminoácidos y el contenido de ligando (mg/ml de gel) se calculó a partir del contenido total de aminoácidos.

20 Proteína

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

Tampón de equilibrio

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

Tampón de adsorción

25 Tampón fosfato PBS 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

30 Se empaquetaron 2 ml de resina en columnas TRICORN™ 5 100. La capacidad de progreso se determinó con un sistema ÄKTAEplorer 10 a un tiempo de residencia de 6 minutos (caudal de 0,33 ml/min). Se pasó el tampón de equilibrio a través de la columna de derivación hasta que se obtuvo una línea base estable. Esto se hizo antes de la puesta a cero automática. La muestra se aplicó a la columna hasta que se obtuvo una señal de UV del 100%. Después, se aplicó de nuevo el tampón de equilibrio hasta que se obtuvo una línea base estable.

35 La muestra se cargó en la columna hasta que se alcanzó una señal de UV del 85% de la 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 tampón de elución con 5 CV a un caudal de 0,5 ml/min. Después, la columna se lavó con NaOH 0,5 M a un caudal de 0,2 ml/min y se volvió a equilibrar con tampón de equilibrio.

40 Para el cálculo de la capacidad de progreso al 10%, se utilizó la siguiente ecuación. Esa es la cantidad de IgG que se carga en la columna hasta que la concentración de IgG en el efluente de la columna es el 10% de la concentración de la 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 señal de UV

A_{sub} = contribución a la absorbancia de la subclase de IgG no enlazante;

A(V) = absorbancia de un volumen aplicado dado;

45 V_c = volumen de columna;

V_{app} = volumen aplicado hasta un progreso del 10%;

V_{sys} = volumen muerto del sistema;

C_0 = concentración de la alimentación.

5 Se calculó la capacidad de unión dinámica (DBC) a un progreso del 10%. La capacidad de unión dinámica (DBC) se calculó para un progreso del 10 y 80%.

CIP – NaOH 0,5 M

10 La DBC (Qb10) a un progreso del 10% se determinó tanto antes como después de exposiciones repetidas a disoluciones de limpieza alcalinas. Cada ciclo incluyó una etapa CIP con NaOH 0,5 M bombeada a través de la columna a un caudal de 0,5 /min durante 20 minutos, después de lo cual la columna se dejó en reposo durante 4 h. La exposición tuvo lugar a temperatura ambiente (22 +/- 2°C). Después de esta incubación, la columna se lavó con tampón de equilibrio durante 20 minutos 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 acumulativo de 24 h a NaOH 0,5 M), tanto en números absolutos como relativos a la capacidad inicial.

Ejemplo 5

15 El Ejemplo 4 se repitió con los ligandos tetraméricos mostrados en la Tabla 5, pero con el NaOH 1,0 M utilizado en las etapas CIP en vez de 0,5 M. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y la Figura 4.

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

Ligando	SEQ ID NO.	Contenido de ligando (mg/ml)	Capacidad de IgG inicial Qb10 (mg/ml)	Capacidad de IgG restante Qb10 después de 6 ciclos de 4h (mg/ml)	Capacidad de IgG restante después de 6 ciclos de 4h (%)	Retención de la capacidad relativa a ref. después de 6 ciclos de 4h
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(no es parte de la invención)	30	9,7	62,1	48,1	77	1,44

20 Esta descripción escrita utiliza ejemplos para describir la invención, incluyendo el mejor modo, y también para permitir que cualquier persona experta en la técnica practique la invención, incluyendo la fabricación y el uso de cualquier dispositivo o sistema y la realización de cualquier método incorporado. El alcance patentable de la invención está definido por las reivindicaciones, y puede incluir otros ejemplos que se les ocurran a los expertos en la técnica. Estos otros ejemplos están destinados a estar dentro del alcance de las reivindicaciones si tienen elementos estructurales que no difieren del lenguaje literal de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de unión a Fc que comprende un mutante de un dominio de unión a Fc de la proteína estafilocócica A (SpA), que es un mutante de Zvar que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO:7, en donde el residuo aminoácido en la posición 9 es alanina y el residuo aminoácido en la posición 11 es lisina o ácido glutámico,
- 5 y adicionalmente en donde:
- i) el residuo aminoácido en la posición 43 es alanina o ácido glutámico; y/o
 - ii) el residuo aminoácido en la posición 40 es valina; y/o
 - iii) el residuo aminoácido en la posición 44 es isoleucina,
- 10 dicho polipéptido tiene una estabilidad alcalina mejorada comparada con la de un polipéptido definido por la SEQ ID NO 7, en donde la mejora en la estabilidad alcalina se mide por la capacidad de unión de la IgG restante después de 24 o 25 h de incubación en NaOH 0,5 M o 1,0 M acuoso a 22 +/- 2 °C.
2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la mutación se selecciona del grupo que consiste en:
 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; Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I y
 15 Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I.
3. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la mutación se selecciona del grupo que consiste en:
 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.
4. El polipéptido según cualquier reivindicación anterior, que comprende o consiste esencialmente en una secuencia
 20 seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 49 y SEQ ID NO 50.
5. Un multímero que comprende o consiste esencialmente en una pluralidad de polipéptidos como se define en cualquier reivindicación anterior, en donde los polipéptidos están unidos por enlazadores que comprenden hasta 15 aminoácidos.
6. Un multímero que comprende o consiste esencialmente en una pluralidad de polipéptidos como se define en cualquier reivindicación anterior, en donde el multímero es un dímero, trímero, tetrámero, pentámero, hexámero,
 25 heptámero, octámero o nonámero.
7. Un multímero que comprende o consiste esencialmente en una pluralidad de polipéptidos como se define en cualquier reivindicación anterior, en donde el multímero comprende o consiste esencialmente en una secuencia
 30 seleccionada del grupo de secuencias definidas por SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34 y SEQ ID NO 35.
8. El polipéptido o multímero según cualquier reivindicación anterior, que además comprende en, o dentro de 1-5 residuos aminoácidos del, C-terminal o N-terminal uno o más elementos de acoplamiento, seleccionados del grupo que consiste en uno o más residuos cisteína, una pluralidad de residuos lisina y una pluralidad de residuos histidina.
9. Un ácido nucleico o un vector que codifican un polipéptido o un multímero según cualquier reivindicación anterior,
 35 o un sistema de expresión, que comprende dicho ácido nucleico o vector.
10. Una matriz de separación, en la que una pluralidad de polipéptidos o multímeros según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 se han acoplado a un soporte sólido.
11. La matriz de separación según la reivindicación 10, en la que los polipéptidos o multímeros se han acoplado al soporte sólido mediante enlaces tioéter.
- 40 12. La matriz de separación según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en la que el soporte sólido es un polisacárido.
13. La matriz de separación según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que la capacidad de la IgG de la matriz después de una incubación de 24 en NaOH 0,5 M a 22 +/- 2 °C es 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.
- 45 14. La matriz de separación según una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que la capacidad de la IgG de la matriz después de una incubación de 24 en NaOH 1,0 M a 22 +/- 2 °C es al menos 70, tal como al menos 80 o al menos 90 % la capacidad de la IgG antes de la incubación.
15. Un método para aislar una inmunoglobulina, en el que se utiliza una matriz de separación según una cualquiera de las reivindicaciones 10-14.

16. El método de la reivindicación 15, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra líquida que comprende una inmunoglobulina con una matriz de separación según una cualquiera de las reivindicaciones 10-14,

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

5 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.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el líquido de limpieza es alcalino, tal como con un pH de 13 - 14.

18. El método de la reivindicación 16 o 17, en el que el líquido de limpieza comprende NaOH o KOH 0,1 – 1,0 M, tal como NaOH o KOH 0,5 – 1,0 M.

10 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que las etapas a) - d) se repiten al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces o 50 - 200 veces.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en el que las etapas a) - c) se repiten al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces o 50 - 200 veces y en el que la etapa d) se lleva a cabo después de varias repeticiones de la etapa c), tal como al menos 10 o al menos 50 veces.

15

Alineación de dominios de unión a fc

E	---	-----AQQ	NAFYQVLNMP	NLNADQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANVLGEAQK	LNDSQAPK	51	(SEQ ID NO: 1)
D	ADA	QQKFNKDOQ	SAFYEILLNMP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	STNVLGTAKK	LNESQAPK	61	(SEQ ID NO: 2)
A	--A	DNN-FNKEQQ	NAFYEILLNMP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNESQAPK	58	(SEQ ID NO: 3)
B	---	ADNKFKEQQ	NAFYEILLHL	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ ID NO: 4)
C	---	ADNKFKEQQ	NAFYEILLHL	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSV	SKEILLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ ID NO: 5)
Z	---	VDNKFKEQQ	NAFYEILLHL	NLNEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ ID NO: 6)
Zvar	---	VDAKFDKEQQ	NAFYEILLHL	NLNEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	58	(SEQ ID NO: 7)
	---	-----KEQQ	NAFYEILLHL	NLNEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNDQAPK	52	(SEQ ID NO: 51)
	---	-----KEQQ	NAFYEILLHL	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSV	SKEILLAEAKK	LNDQAPK	52	(SEQ ID NO: 52)
Pos	1	10	20	30	40	50	58		

Fig. 1

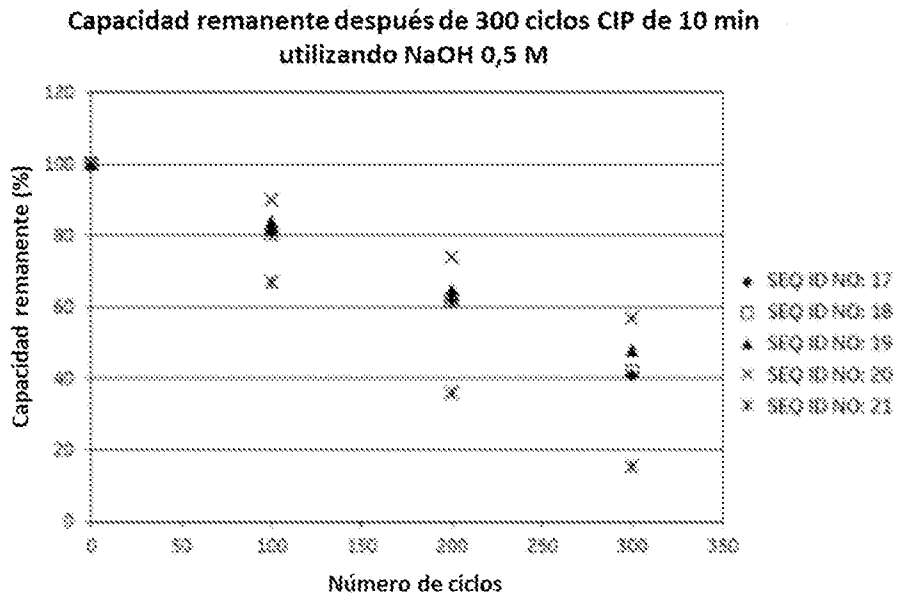


Fig. 2

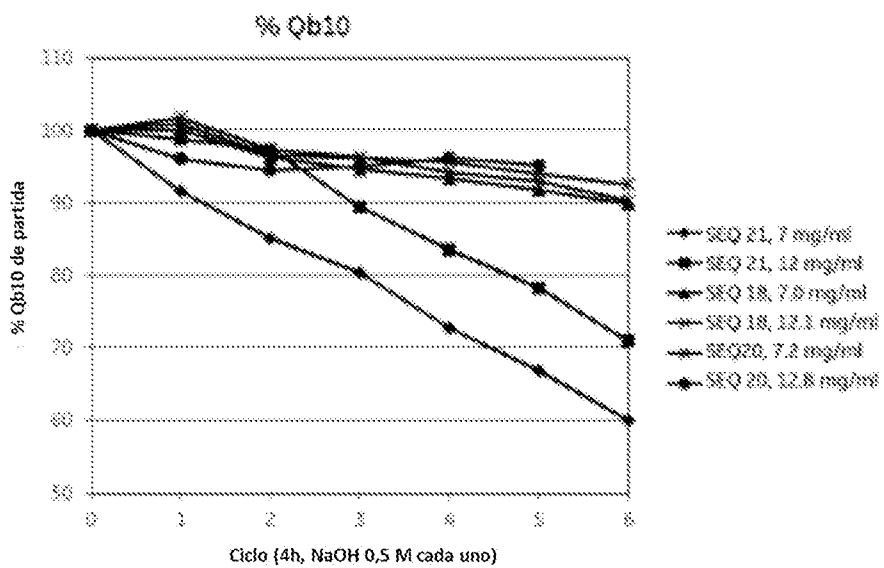


Fig. 3

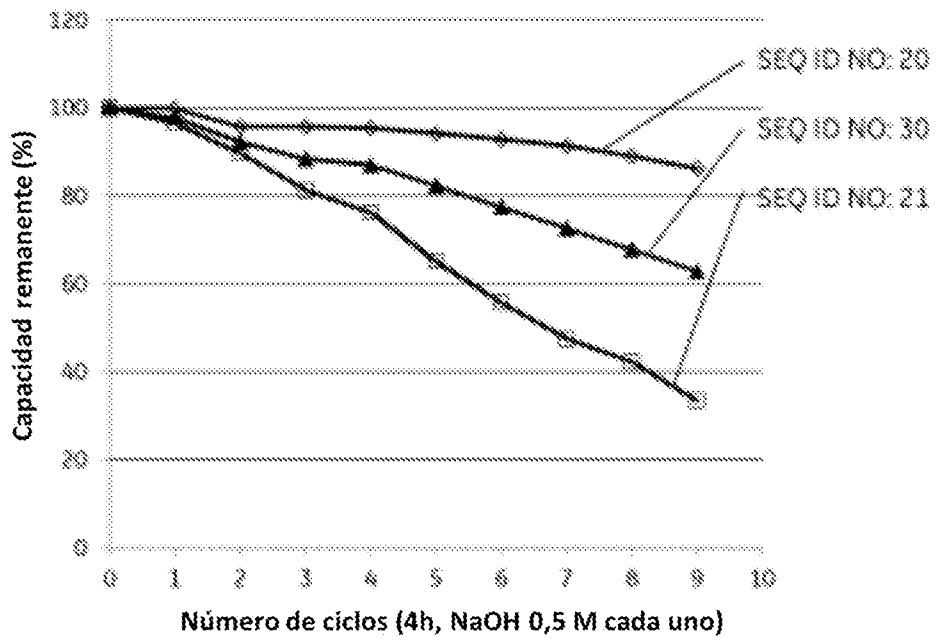


Fig. 4.