

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 115**

51 Int. Cl.:

B01J 20/286 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2018** **PCT/EP2018/084702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019** **WO19121296**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2018** **E 18825939 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022** **EP 3727680**

54 Título: **Un método para la preparación de una matriz de separación**

30 Prioridad:

20.12.2017 GB 201721476

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

23.09.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RODRIGO, GUSTAV;
ANDER, MATS;
PALMGREN, RONNIE y
BJORKMAN, TOMAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 923 115 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

Un método para la preparación de una matriz de separación

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a la fabricación de matrices de separación por afinidad y, en particular, a la fabricación de matrices de separación por afinidad que comprenden ligandos unidos covalentemente derivados de proteínas de unión a inmunoglobulinas bacterianas tales como Proteína A de *Staphylococcus* (SpA) Proteína L de *Peptostreptococcus* (PpL) o Proteína G de *Streptococcus* (SpG). La invención se refiere particularmente a la fabricación de matrices que comprenden variantes estables a los álcalis de estas proteínas de unión a inmunoglobulinas.

Antecedentes de la invención

Una de las clases más importantes de nuevos compuestos farmacéuticos son los anticuerpos monoclonales (mAbs) terapéuticos. En la fabricación de estos, la cromatografía de afinidad en matrices que comprenden proteína A de *Staphylococcus* (SpA) o variantes de SpA unidas covalentemente se utilizan casi de manera universal como una primera etapa de separación para retirar la mayoría de los contaminantes que se originan en los caldos de cultivo celular que comprenden los mAbs. Las demandas de pureza en el producto de mAb final son altas y es esencial que se minimice cualquier fuga de ligando de SpA de las matrices, para evitar tener que retirar ligandos que fugan mediante pasos de cromatografía posteriores. Tales etapas se han descrito en p. ej., los documentos US6121428, US7223848, US7847071, US20080312425, US8053565 y US7714112. Los métodos para reducir las cantidades de ligando que fugan de las matrices durante el uso se divulgan en los documentos US7485704, US7589183 y US20030148540.

El documento EP 3 050 902 A1 divulga un método para la preparación de una matriz de separación, que comprende las etapas:

a) proporcionar un soporte sólido de perlas porosas de celulosa reticulada con epíclorhidrina y un ligando de proteína A controlado por orientación estable a los álcalis;

b) hacer reaccionar dicho ligando estable a los álcalis con dicho soporte sólido para formar una matriz de separación que tiene ligandos estables a los álcalis acoplados covalentemente; y

c) lavar dicha matriz de separación que tiene ligandos estables a los álcalis acoplados covalentemente con una solución acuosa de ácido cítrico 0,1 N y luego dos veces durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) con una solución de lavado que comprende 50 mM de NaOH.

La SpA es un miembro de la clase de proteínas de unión a inmunoglobulina bacteriana (IBP), según lo revisado por EV Sidorin y TF Soloveva en *Biochemistry* (Moscú), vol. 76, n.º 3, pág. 295-308 (2011). Tal como se discutió anteriormente, la SpA es la IBP más común utilizada en cromatografía de afinidad de anticuerpos completos, lo que se debe a su unión altamente selectiva a la parte Fc de las inmunoglobulinas intactas. Sin embargo, también existe una fuerte tendencia a desarrollar fragmentos de anticuerpos y otros constructos de anticuerpos que carecen de la parte Fc. En este caso, se utilizan IBP, que se unen a otras partes además de la parte Fc, sobre todo Proteína L de *Peptostreptococcus magnus* (PpL), que se une a las cadenas ligeras de IgG tipo κ y Proteína G de *Streptococcus* (SpG), que se une a la cadena pesada de fragmentos Fab.

En la fabricación de matrices de separación por afinidad con ligandos de IBP tales como SpA, PpL o SpG, los soportes sólidos, tales como partículas de soporte poroso, se activan normalmente para producir grupos capaces de reaccionar con los ligandos de IBP, y las partículas de soporte activadas luego se hacen reaccionar con ligandos de IBP para lograr el acoplamiento covalente deseado. Sin embargo, dado que debe aplicarse un determinado exceso de ligando, la matriz también comprenderá ligandos unidos de forma no covalente, que pueden disolverse libremente o asociarse físicamente con la matriz. Los ligandos libres son potencialmente tóxicos y para retirar estos ligandos unidos de forma no covalente en la medida necesaria para una fuga insignificante o mínima, se necesitan extensas operaciones de lavado, lo que aumenta la complejidad y el coste del proceso de fabricación.

En consecuencia, existe la necesidad de un método mejorado para fabricar matrices de separación por afinidad con baja fuga de ligandos de IBP tales como SpA, PpL o SpG.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención es proporcionar un método de fabricación eficaz para una matriz de separación con baja fuga de ligandos de IBP tales como SpA, PpL o SpG. Esto se consigue con un método según la reivindicación 1.

Una ventaja es que el lavado con álcali/NaOH/KOH en la etapa c) retira eficazmente cualquier ligando unido de forma no covalente, de modo que solo se necesita un número limitado de etapas de lavado para reducir la fuga de ligando a niveles aceptables. Otra ventaja es que los grupos reactivos restantes, tales como grupos epóxido, se inactivan mediante el lavado con álcali/NaOH/KOH.

En las reivindicaciones dependientes se describen realizaciones adecuadas adicionales de la invención.

Dibujos

La Fig. 1 muestra la capacidad de unión a IgG estática restante de una matriz de separación de Proteína A estable a los álcalis tras 18 h de incubación en diferentes soluciones de lavado.

La Fig. 2 muestra la retirada de ligando no unido de una matriz de separación de Proteína A estable a los álcalis durante a) 5 y b) 10 etapas de lavado subsiguientes de 10 min.

La Fig. 3 muestra la retirada de ligando no unido de una matriz de separación de proteína A estable a los álcalis durante una secuencia de 10 etapas de lavado con NaOH, 3 etapas con HAc/EtOH y 5 etapas con NaAc.

Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "que contiene", "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de EE. UU. y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" también tiene el significado que se le atribuye en la ley de patentes de los EE.UU. y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se enumera, siempre que las características básicas o novedosas de lo que se enumera no cambian por la presencia de más de lo que se enumera, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

El término "% de identidad" con respecto a las comparaciones de secuencias de aminoácidos se determina mediante algoritmos de alineación convencionales tales como, por ejemplo, la Herramienta de alineación local básica (BLAST™) descrita en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-410. Un software basado en la web para esto está disponible gratuitamente en la Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. En este caso, el algoritmo "blastp (protein-protein BLAST)" se usa para la alineación de una secuencia de consulta con una secuencia sujeto y determinar, entre otras, la identidad.

Descripción detallada de realizaciones

En un aspecto, la presente invención divulga un método para la preparación de una matriz de separación, que comprende las etapas de a) - c). Este método también se puede describir como un método para retirar el ligando de Proteína A, Proteína L o Proteína G unido de forma no covalente de la matriz de separación, durante o inmediatamente después de la preparación. Como tal, también es un método para preparar una matriz de separación que comprende ligandos de Proteína A, Proteína L o Proteína G estables a los álcalis acoplados covalentemente y que está sustancialmente libre de ligandos de Proteína A, Proteína L o Proteína G acoplados de forma no covalente:

a) Proporcionar un soporte sólido y un ligando de Proteína A, Proteína L o Proteína G estable a los álcalis. El soporte sólido puede comprender una pluralidad de partículas de soporte porosas, que pueden, p. ej., comprender un polisacárido reticulado, tal como agar o agarosa. Las partículas de soporte poroso pueden tener forma adecuada de perlas, p. ej., con una esfericidad de al menos 0,9, donde la esfericidad se define como la relación del área superficial de una esfera con el mismo volumen que la partícula dada con respecto al área superficial de la partícula. El diámetro medio ponderado por volumen (d_{50,v}) de las partículas puede, p. ej., ser de 10-200 micrómetros, tal como 20-150 micrómetros. A continuación se analizan propiedades adicionales de las partículas de soporte poroso. Alternativamente, el soporte sólido puede comprender una membrana porosa o un monolito poroso, p. una membrana fibrosa, tal como una membrana de nanofibras no tejidas. La naturaleza del ligando de Proteína A, Proteína L o Proteína G estable a los álcalis también se analiza más adelante. El ligando comprende adecuadamente residuos de aminoácidos capaces de reaccionar químicamente con grupos reactivos en las partículas de soporte poroso o soporte sólido. Dichos residuos de aminoácidos pueden ser lisinas con una amina reactiva, histidinas con un imidazol reactivo y/o cisteína con un tiol reactivo.

b) Hacer reaccionar el ligando de Proteína A estable a los álcalis, Proteína L o Proteína G con las partículas de soporte poroso o soporte sólido para formar una matriz de separación que tiene ligandos de Proteína A, Proteína L o Proteína G estables a los álcalis acoplados covalentemente. La etapa b) puede estar precedida por una etapa a') de activación de partículas de soporte poroso o soporte sólido. Esto puede, p. ej., implicar la formación de grupos aldehído o epóxido en las partículas de soporte, p. ej., por oxidación con peryodato de dioles vecinales o por reacción con epíclorhidrina o un epóxido difuncional tal como butanodiol diglicidil éter. Los grupos aldehído se pueden usar para el acoplamiento de aminas en los ligandos (por ejemplo, residuos de lisina) mediante aminación reductora, mientras que los grupos epóxido se pueden usar para el acoplamiento de grupos nucleófilos, tal como aminas (por ejemplo, residuos de lisina), imidazoles (histidinas) o tioles (por ejemplo, residuos de cisteína). Si quedan grupos epóxido después de la etapa b), se convertirán en dioles no reactivos mediante el lavado alcalino en la etapa c). Esto evita la necesidad de aplicar cualquier reactivo de desactivación específico, tal como tioles (normalmente tioglicerol o mercaptoetanol) o aminas (p. ej., etanolamina) y la necesidad de monitorizar cualquier fuga potencial del agente de desactivación del producto final. Los métodos de activación y acoplamiento son generalmente bien conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en G T Hermanson, A K Mallia, P K Smith: Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press 1992, pág. 51-136 y 195-251. Se proporcionan ejemplos específicos de métodos de activación y acoplamiento que se pueden usar con ligandos de Proteína A, Proteína L o Proteína G estables a los álcalis en la etapa b) en, p. ej., los documentos US20170334954, US6399750, US8114611, US8674073, US2010221844 y US9040661. El contenido de ligando de la

matriz de separación puede ser adecuadamente de al menos 11 mg de ligando unido covalentemente por ml de matriz de separación, tal como al menos 15 mg/ml, 11-20 mg/ml o 15-20 mg de ligando por ml de matriz de separación. Con altos contenidos de ligando, los riesgos de fuga de ligando son mayores y aumentan las demandas de eficiencia en el método de lavado.

- 5 c) Lavar la matriz de separación que tiene ligandos de Proteína A, Proteína L o Proteína G estables a los álcalis acoplados covalentemente con una solución de lavado que comprende al menos hidróxido alcalino 50 mM, tal como NaOH o KOH. La solución de lavado puede comprender NaOH o KOH 40 mM - 1 M, NaOH o KOH 50 mM - 1 M o NaOH o KOH 90 mM - 1 M, tal como NaOH o KOH 90 mM - 0,5 M, o NaOH o KOH 90 - 200 mM o KOH o NaOH 40 - 200 mM. En caso de que se utilice una mezcla de NaOH y KOH, estos valores se refieren a la concentración total de hidróxido de metal alcalino. En la etapa de lavado, la matriz de separación puede, p. ej., incubarse con la solución de lavado durante 2-30 min, tal como 5-30 min o 5-15 min. Después de la incubación, la solución de lavado puede retirarse de las matrices de partículas mediante filtración, aunque también son posibles otros métodos, tal como la sedimentación. En el último caso, la sedimentación potenciada, p. ej., por centrifugación (p. ej., en una centrífuga decantadora), es preferible evitar las etapas de sedimentación por gravedad lenta. La filtración se puede utilizar tanto a pequeña escala de laboratorio, donde se puede utilizar una placa de filtro, una columna de cromatografía, etc., como a una escala de laboratorio intermedia con, p. ej., un embudo de filtro de vidrio o embudo Buchner, y en producción a gran escala, donde p. ej., se puede utilizar convenientemente un filtro Nutsch agitado. La temperatura durante la etapa c) puede, p. ej., ser de 2-40 °C, tal como 15-30 °C o 20-25 °C. La etapa c) puede repetirse adecuadamente al menos una vez, tal como al menos 5 veces o 5-15 veces. El lavado se puede realizar adecuadamente en el plazo de las 24 h después de la etapa b). Después de la etapa c), el método puede comprender además una etapa d) de transferir la matriz de separación a una solución de almacenamiento. Después de esto, la matriz de separación puede distribuirse adicionalmente en contenedores de transporte para su envío a los clientes. Después de la etapa c), la matriz de separación está convenientemente libre sustancialmente de ligandos de Proteína A, Proteína L o Proteína G unidos de forma no covalente. Esto se puede valorar con una prueba de fuga de ligando descrita aquí para la Proteína A (adecuadamente realizada a 22±2 °C), donde la matriz de separación se empaqueta en una columna de cromatografía, cargada con 16,65 mg de IgG policlonal (en un tampón de carga de NaH_2PO_4 0,020 M, pH 7,0) por ml de matriz y se eluye con un tampón de elución de glicina 0,1 M, pH 3,0, para producir un eluato donde todas las fracciones de eluato que contienen IgG se combinan para formar un grupo de IgG y el contenido de ligando en el grupo de IgG es medido con un ensayo ELISA de Proteína A. Si el contenido de ligando es inferior a aproximadamente 40 ng de ligando por mg de IgG en el grupo, preferiblemente inferior a aproximadamente 30 ng, se considera que la matriz de separación está sustancialmente libre de ligandos de Proteína A unidos de forma no covalente. Pueden usarse métodos análogos para determinar la fuga de ligandos de Proteína L o Proteína G y la ausencia correspondiente de dichos ligandos unidos de forma no covalente.

Partículas de soporte poroso

- 35 Las partículas de soporte poroso pueden ser de cualquier tipo conocido adecuado. Una matriz de separación por afinidad convencional suele ser 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 forma sustituida), oligo- o polietilenoxilo en sus superficies externas y, si están presentes, también en las internas. La naturaleza porosa de las partículas de soporte hace que su interior sea accesible a los ligandos y a las inmunoglobulinas. En términos cuantitativos, la propiedad porosa se puede expresar como un valor de K_{av} o K_d (la fracción del volumen de poro disponible para una molécula sonda de un tamaño particular) medido por cromatografía de exclusión de tamaño inverso, p. ej., según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, págs. 6-13. K_{av} se determina como la relación $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, donde V_e es el volumen de elución de una molécula sonda (por ejemplo, Dextrano 110 kDa), V_0 es el volumen de vacíos de la columna (p. ej., el volumen de elución de un marcador de vacíos de alto Pm, tal como el dextrano bruto) y V_t es el volumen total de la columna. K_d se puede determinar como $(V_e - V_0)/V_i$, donde V_i es el volumen de elución de una sal (p. ej., NaCl) capaz de acceder a todo el volumen excepto el volumen de la matriz (el volumen ocupado por las moléculas del polímero de la matriz). Por definición, los valores de K_d y K_{av} siempre se encuentran dentro del intervalo de 0 - 1. El valor de K_{av} puede ser ventajosamente de 0,6 - 0,95, p. ej., 0,7 - 0,90 o 0,6 - 0,8, medido con dextrano de Pm 110 kDa como molécula sonda. El valor de K_d medido con dextrano de Pm 110 kDa puede ser adecuadamente 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 acomodar tanto los ligandos como las inmunoglobulinas que se unen a los ligandos y proporcionar un transporte masivo de las inmunoglobulinas hacia y desde los sitios de unión. Alternativamente, las partículas de soporte pueden ser esencialmente no porosas, tal como cuando el valor de K_d para dextrano de Pm 110 kDa está por debajo de 0,1 o por debajo de 0,05. Tales partículas son principalmente interesantes para separaciones analíticas y pueden tener un diámetro medio ponderado por volumen ($d_{50,v}$) de menos de 10 micrómetros, tal como 1-10 o 1-5 micrómetros.

- En determinadas realizaciones, el soporte sólido o las partículas de soporte comprenden un polímero polihidroxilado, tal como un polisacárido. Los ejemplos de polisacáridos incluyen, p. ej., dextrano, almidón, celulosa, pululano, agar, agarosa, etc. Los polisacáridos son inherentemente hidrófilos con bajos grados de interacciones no específicas, proporcionan un alto contenido de grupos hidroxilo reactivos (activables) y generalmente son estables frente al lavado alcalino.

En algunas realizaciones, las partículas de soporte comprenden agar o agarosa. Tales partículas se pueden preparar fácilmente de acuerdo con métodos convencionales, tales como la gelificación de suspensión inversa (S Hjertén: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964). Alternativamente, las partículas de soporte son productos disponibles comercialmente, tal como perlas de agarosa reticulada que se venden con el nombre de SEPHAROSE™ FF (GE Healthcare). En una realización, que es especialmente ventajosa para separaciones a gran escala, las partículas de soporte se han adaptado para aumentar su rigidez utilizando los métodos de reticulación descritos en los documentos US6602990 o US7396467 y, por lo tanto, hacer que las partículas sean más adecuadas para caudales elevados.

En determinadas realizaciones, el soporte sólido o las partículas de soporte, tales como las partículas de soporte de polímero, polisacárido o agarosa, se reticulan, tal como con reticulaciones de hidroxialquil éter.

Los reactivos de reticulación que producen tales reticulaciones pueden ser, p. ej., epihalohidrinatos como epiclorhidrina, diepóxidos como butanodiol diglicidil éter, reactivos de alilación como haluros de alilo o alil glicidil éter. La reticulación es beneficiosa para la rigidez de las partículas de soporte y mejora la estabilidad química. Las reticulaciones de hidroxialquil éter son estables a los álcalis y no provocan ninguna adsorción no específica significativa.

Alternativamente, el soporte sólido o las partículas de soporte poroso pueden basarse en polímeros sintéticos, tales como poli(alcohol vinílico), acrilatos de polihidroxialquilo, metacrilatos de polihidroxialquilo, poli(acrilamidas, polimetacrilamidas, etc. En el caso de polímeros hidrófobos, tales como partículas a base de bencenos sustituidos con monovinilo y divinilo, la superficie de la matriz a menudo se hidrofiliiza para exponer los grupos hidrófilos tal como se definió anteriormente a un líquido acuoso circundante. Dichos polímeros se producen fácilmente de acuerdo con métodos convencionales, véase, p. ej., "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)). Alternativamente, se utiliza un producto disponible comercialmente, tal como SOURCE™ (GE Healthcare). En otra alternativa, las partículas de soporte son magnéticas. Un ejemplo de dichas partículas de soporte son polisacáridos o perlas de polímeros sintéticos que comprenden, p. ej., partículas de magnetita, de modo que las perlas se puedan usar en separaciones magnéticas en discontinuo.

Ligando de proteína A estable a los álcalis

El ligando de proteína A estable a los álcalis puede ser capaz de resistir la incubación con NaOH 0,5 o 0,1 M durante 100 x 10 min a 22+/- 2 °C con menos del 45 % de reducción en la capacidad de unión frente a IgG, en relación con la capacidad de unión de IgG antes de la incubación. La reducción de la capacidad de unión de IgG puede ser adecuadamente inferior al 45 %, tal como inferior al 20 % o inferior al 10 %. Esto puede medirse adecuadamente acoplado el ligando a un chip de resonancia de plasmones superficiales (SPR), p. ej., a los chips sensores Biacore CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) tal como se describe en el documento US20170334954, usando p. ej. química de acoplamiento NHS, y midiendo la capacidad de unión de inmunoglobulina del chip en un instrumento Biacore (GE Healthcare Bio-Sciences AB), normalmente usando IgG humana policlonal, antes y después de la incubación del chip en NaOH 0,5 M durante ciclos de 100 x 10 min. Alternativamente, la estabilidad alcalina se puede definir de tal manera que la matriz de separación con los ligandos unidos covalentemente sea capaz de resistir la incubación con NaOH 0,5 M o 0,1 M durante 100 x 15 min a 22+/- 2 °C con menos del 20 % de reducción en capacidad de unión frente a IgG, en relación con la capacidad de unión de IgG antes de la incubación. La reducción de la capacidad de unión de IgG puede ser adecuadamente inferior al 15 %, tal como inferior al 10 % o inferior al 5 %. La valoración se puede realizar midiendo la capacidad dinámica de ruptura del 10 % (Qb10%) a un tiempo de residencia de 2,4 o 6 min, tal como se describe en el documento US20170334954.

El ligando de proteína A estable a los álcalis puede comprender adecuadamente uno o más dominios de unión a IgG mutados de SpA. Los dominios de SpA nativos son el dominio E (SEQ ID NO. 1), el dominio D (SEQ ID NO. 2), el dominio A (SEQ ID NO. 3), el dominio B (SEQ ID NO. 4) y el dominio C (SEQ ID NO. 1). Las mutaciones pueden implicar la sustitución de uno o más residuos de asparagina por otros residuos de aminoácidos, pero también son posibles otras mutaciones. La estructura del ligando de Proteína A estable a los álcalis puede ser normalmente una proteína L-(Dominio-S)_n-T, donde L es una secuencia líder de 1-10 aminoácidos que incluye el extremo N-terminal, Dominio es el dominio de unión a IgG (mutado), S es una secuencia de espaciador de 1-15 aminoácidos opcional, n es 1-10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, p. ej., 3-7 o 4-6, y T es una secuencia de cola de 0-10 aminoácidos, que incluye el extremo C-terminal (si T tiene al menos un residuo de aminoácido). Para el acoplamiento de punto final, L o T pueden comprender un resto de acoplamiento, p. ej., una cisteína o una pluralidad de lisinas o histidinas. El extremo C-terminal puede, p. ej., ser una cisteína.

Los ligandos de proteína A estables a los álcalis se pueden dividir en principio en dos niveles, con diferentes grados de estabilidad a los álcalis. El primer nivel incluye ligandos capaces de resistir la incubación en NaOH 0,5 M, tal como se explicó anteriormente, y el segundo nivel incluye ligandos capaces de resistir la incubación en NaOH 0,1 M, tal como se explicó anteriormente, pero no NaOH 0,5 M. Ambos ligandos de primer y segundo nivel pueden usarse en los métodos de la invención, pero los ligandos de primer nivel permiten una elección más libre de las condiciones de lavado. Los ligandos del primer nivel incluyen ligandos que comprenden las siguientes secuencias de Dominio: SEQ ID NO: 8-11, 17-23, 32, 34, 36-47, 49-50, 54-62, 65-69, 71, 136-138 y 142-147. Los ligandos de segundo nivel incluyen ligandos que comprenden las siguientes secuencias de Dominio: SEQ ID NO: 5, 7, 12-15, 24-31, 33, 35, 48, 51-53, 63-64, 70, 72-135 y 139-141. Los ligandos pueden, p. ej., comprender Dominios que tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del

grupo que consiste en SEQ ID NO 5 y 7-141. Alternativamente, pueden, p. ej., comprender Dominios que tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad con respecto una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 8-11, 17-23, 32, 34, 36-47, 49-50, 54-62, 65-69, 71 y 136-138. Convenientemente, todos los Dominios en los ligandos comprenden secuencias tal como se discutió anteriormente.

5 Además, cualquier secuencia L, S y/o T puede ser adecuadamente estable a los álcalis, p. ej., al no contener residuos de asparagina. Las secuencias de Dominio se enumeran a continuación, con indicaciones sobre dónde se muestra la información sobre su estabilidad alcalina.

SEQ ID NO 1 (dominio E de SpA)

AQQ NAFYQV̄LNMP NLNADQRNGF IQSLKDDPSQ SANVLGEAQK LNDSQAPK

10 SEQ ID NO 2 (dominio D de SpA)

ADA QQNKFNKDQQ SAFYEILNMP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ STNVLGEAKK
LNESQAPK

SEQ ID NO 3 (dominio A de SpA)

A DNNFNKEQQ NAFYEILNMP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNESQAPK

SEQ ID NO 4 (dominio B de SpA)

15 ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 5 (dominio C de SpA)

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 6 (Proteína Z) documento US7834158

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

20 SEQ ID NO 7 (Zvar) documento US7834158

VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 8 Zvar(Q9A,N11E,N43A) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 9 Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A) documento WO2017194594A1

25 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 10 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 11 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

30 SEQ ID NO 12 Zvar(N11E,Q32A) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IASLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 13 Zvar(N11E) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 14 Zvar(N11E,Q32E,Q40E) documento WO2017194594A1

5 VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSE SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 15 Zvar(N11E;Q32E,K50R) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSQ SANLLAEAKR
LNDQAAPK

SEQ ID NO 16 Zvar(N11K) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ KAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

10 SEQ ID NO 17 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDQAAPK

SEQ ID NO 18 Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 19 Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) documento WO2017194594A1

15 VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDQAAPK

SEQ ID NO 20 Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 21 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK
LNDQAAPK

20 SEQ ID NO 22 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKR
LNDQAAPK

SEQ ID NO 23 Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 24 Zvar(D37E) documento WO2016079034A1

25 VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 25 C(Q9A,N11E,E43A) documento WO2017194594A1

ADNKFNKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 26 Zvar(N11Y) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ YAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 27 Zvar(N11T) documento WO2017194594A1

5 VDAKFDKEQQ TAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 28 Zvar(N11F) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ FAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 29 Zvar(N11L) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ LAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

10 SEQ ID NO 30 Zvar(N11W) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ WAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 31 Zvar(N11I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ IAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 32 Zvar(N11M) documento WO2017194594A1

15 VDAKFDKEQQ MAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 33 Zvar(N11V) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ VAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 34 Zvar(N11A) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ AAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

20 SEQ ID NO 35 Zvar(N11H) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ HAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 36 Zvar(N1 1R) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEQQ RAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 37 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

25 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 38 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 39 Zvar(Q9A,N11E, A29G,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 40 Zvar(Q9A,N11E, A29S,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

5 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNSF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 41 Zvar(Q9A,N11E, A29Y,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNYF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 42 Zvar(Q9A,N11E, A29Q,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNQF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

10 SEQ ID NO 43 Zvar(Q9A,N11E, A29T,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNTF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 44 Zvar(Q9A,N11E, A29N,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNNF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 45 Zvar(Q9A,N11E, A29F,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

15 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNFF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 46 Zvar(Q9A,N11E, A29L,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNLF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 47 Zvar(Q9A,N11E, A29W,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNWF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

20 SEQ ID NO 48 Zvar(Q9A,N11E, A29I,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNIF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 49 Zvar(Q9A,N11E, A29M,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNMF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 50 Zvar(Q9A,N11E, A29V,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

25 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNVF IQSLKDDPSV SKILAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 51 Zvar(Q9A,N11E, A29D,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNDF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 52 Zvar(Q9A,N11E, A29E,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNEF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 53 Zvar(Q9A,N11E, A29H,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNHF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

5

SEQ ID NO 54 Zvar(Q9A,N11E, A29R,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNRF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 55 Zvar(Q9A,N11E, A29K,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNKF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

10 SEQ ID NO 56 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53F) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNFAQAPK

SEQ ID NO 57 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53Y) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNYAQAPK

SEQ ID NO 58 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53W) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNWAQAPK

15

SEQ ID NO 59 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53K) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNKAQAPK

SEQ ID NO 60 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53R) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNRAQAPK

20 SEQ ID NO 61 Zvar(Q9del,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKE_Q EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 62 Zvar(Q9A,N11E, Q40del,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPS_ SKAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 63 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42del,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV S_AILAEAKK
LNDQAAPK

25

SEQ ID NO 64 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43del,L44I) documento WO2017194594A1

VDÄKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SK_ILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 65 Zvar(D2del,A3del,K4del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

V__FDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 66 Zvar(V1del,D2del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,K58del) documento WO2017194594A1

__AKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAP_

5 SEQ ID NO 67 Zvar(K4del,F5del,D6del,K7del,E8del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento
WO2017194594A1

VDA__AQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 68 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,A56del,P57del,K58del) documento WO2017194594A1

10 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQ__

SEQ ID NO 69 Zvar(V1del,,D2del,A3del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) documento WO2017194594A1

__KFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 70

Zvar(V1del,D2del,A3del,K4del,F5del,D6del,K7del,E8del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)

15 documento WO2017194594A1

__AQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 71 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,K58_insYEDG) documento WO2017194594A1

VDÄKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND AQAPKYE DG

SEQ ID NO 72 C(G29A) documento US8329860

20 ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 73 C(N3del,K4del,F5del,N6del) documento US8329860

AD__KEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 74 C(N3del,K4del,F5del,N6del,G29A) documento US8329860

AD__KEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

25 SEQ ID NO 75 C(A1del,D2del,N3del,K4del) documento US9018305

__FNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 76 C(A1del,D2del,N3del) documento US9018305

____KFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 77 C(A1del,D2del,N3del,K4del,G29K) documento WO2013109302

____FNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNKF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 78 C(A1del,D2del,N3del,G29K) documento WO2013109302

5 ____KFNKEQQ `NAFYÉILHLP NLTEEQRNKF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 79 C(A1V,G29A) documento US9040661

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 80 C(G29E) documento US9403883

AD`NKFNKEQQ `NAFYÉILHLP NLTEEQRNEF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

10 SEQ ID NO 81 C(G29R) documento US9403883

AD`NKFNKEQQ `NAFYÉILHLP NLTEEQRNRF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 82 C(G29I) documento US9403883

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNIF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 83 C (G29L) documento US9403883

15 ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNLF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 84 C(G29F) documento US9403883

AD`NKFNKEQQ `NAFYÉILHLP NLTEEQRNFF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 85 C(G29Y) documento US9403883

AD`NKFNKEQQ `NAFYÉILHLP NLTEEQRNYF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

20 SEQ ID NO 86 C(G29M) documento US9403883

AD`NKFNKEQQ `NAFYÉILHLP NLTEEQRNMF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 87 C (G29W) documento US9403883

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNWF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 88 C(G29V) documento US9403883

25 ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNVF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 89 C(G29T) documento US9403883

ADNKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNTF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 90 C(G29D) documento US9403883

ADNKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNDF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 91 C(G29H) documento US9403883

5 ADNKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNHF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 92 C(G29S) documento US9403883

ADNKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNSF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 93 C(G29K) documento WO2013109302

ADNKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNKF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

10 SEQ ID NO 94 C(N3G,N6E,G29A,V400,K42T,E43N,I44V,A46G) documento US20160237124

ADGKFEKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ STNVLGEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 95 C(N3G,N6E,G29A,Q32K,L34I,K35R,V40Q,K42T,E43N,I44V,A46G) documento US20160237124

ADGKFEKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IKSIRDDPSQ STNVLGEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 96 C(A1V,N3insF,G29A) documento WO2016152946

15 VDNKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 97 C(A1V,N3insL,G29A) documento WO2016152946

VDNLKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 98 C(A1V,N3insI,G29A) documento WO2016152946

VDNIKNEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

20 SEQ ID NO 99 C(A1V,N3insP,G29A) documento WO2016152946

VDNPKNEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 100 C(A1V,N3insQ,G29A) documento WO2016152946

VDNQKNEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 101 C(A1V,N3insH,G29A) documento WO2016152946

25 VDNHKNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 102 C(A1V,N3insR,G29A) documento WO2016152946

VDNRKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AOAPK

SEQ ID NO 103 C(A1V,N3insT,G29A) documento WO2016152946

VDNTKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

5 SEQ ID NO 104 C(A1V,N3insY,G29A) documento WO2016152946

VDNYKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 105 C(A1V,N3insA,G29A) documento WO2016152946

VDNAKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 106 C(A1V,N3insM,G29A) documento WO2016152946

10 VDNMKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 107 C(A1V,N3insD,G29A) documento WO2016152946

VDNDKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 108 C(A1V,N3insW,G29A) documento WO2016152946

VDNWKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

15 SEQ ID NO 109 C(A1V,N3insE,G29A) documento WO2016152946

VDNEKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 110 C(A1V,N3insV,G29A) documento WO2016152946

VDNVKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 111 C(A1V,N3insIT,G29A) documento WO2016152946

20 VDNITKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 112 Z(N23H) documento WO2012083425

VDN`KFNKEQQ NAFYEILHLP NLH`EEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LND AOAPK

SEQ ID NO 113 Z(N23S) documento WO2012083425

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLSEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LND AQAPK

25 SEQ ID NO 114 Z(N3H,N23S) documento WO2012083425

VDH`KFNKEQQ NAFYEILHLP NLSEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 115 Z(N3H,N23T) documento WO2012083425

VD~~H~~KFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 116 Z(N3H,N6D,N23S) documento WO2012083425

VD~~H~~KFDKEQQ NAFYEILHLP NLSEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

5 SEQ ID NO 117 C(G29A,P57del) documento EP1992692A1

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAQ_K

SEQ ID NO 118 Z(N3D,N6L,L19del,N23T) documento CN105481954A

VDDKFLKEQQ NAFYEILH_P NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 119 Z(N3A,N6D,Q9A,N23T) documento US20160159855

10 VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 120 Z(N3A,N6D,Q9A,E15K,N23T) documento US20160159855

VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 121 Z(N3A,N6D,Q9A,N23T,E47T) documento US20160159855

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK
LNDQAQPK

15 SEQ ID NO 122 Z(N3A,N6D,Q9A,N23T,D36T) documento US20160159855

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 123 Z(N3A,N6D,Q9A,N23T,D36A) documento US20160159855

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKADPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 124 Z(N3A,N6D) Q9T,N23T,D36T) documento US201601 59855

20 VDAKFDKETQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 125 Z(N3A,N6D,Q9A,N23T,Q26A,D36A,E47A) documento US20160159855

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEARNAF IQSLKADPSQ SANLLAAAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 126 Z(N3A,N6D,Q9A,N23T,E47T,K49E,N52S) documento US20160159855

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAEK
LSDAQAPK

25 SEQ ID NO 127 Z(N3A,N6D,Q9T,N23T, E47T) documento US20160159855

VDAKFDKETQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 128 Z(N3A,N6D,Q9W,N23T) documento US 14/961164

VDAKFDKEWQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 129 Z(N3A,N6D,Q9L,N23T) documento US 14/961164

VDAKFDKELQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

5 SEQ ID NO 130 Z(N3A,N6D,Q9E,N23T) documento US 14/961164

VDAKFDKEEQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 131 Z(N3A,N6D,Q9K,N23T) documento US 14/961164

VDAKFDKEKQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 132 Z(N3A,N6D,Q9V,N23T) documento US 14/961164

10 VDAKFDKEVQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 133 Zvar(A42R) documento WO2016079034A1

VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SRNLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 134 Zvar(S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) documento WO2016079034A1

VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDAQAPK

15 SEQ ID NO 135 Zvar(H18K, S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) documento WO2016079034A1

VDAKFDKEQQ NAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDAQAPK

SEQ ID NO 136 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) documento WO2016079034A1

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDAQAPK

SEQ ID NO 137 Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y) documento WO2016079034A1

20 VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDAQAPK

SEQ ID NO 138 Zvar(N1 1K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I) documento WO2016079034A1

VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 139 Z(N23T) documento US7834158

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

25 SEQ ID NO 140 Z(N3A,N23T) documento US7834158

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAA IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAAPK

SEQ ID NO 141 Z(K4G,N23T) documento US7834158

VDNGFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAA IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 143 documento WO2018029158

IAAQHDKEQQ AAFYEILHLP NLTEDQRNAA IQSLRDDPSV SLEILGEAKK LNDQAQPK

5 SEQ ID NO 144 documento WO2018029158

IAAQHDKDQQ AAFYEILHLP NLTEEQRNAA IQSLRDDPSV SLEILAEAKK LNDQAQPK

SEQ ID NO 145 documento WO2018029158

IAAQHDKEHQ AAFYEILHLP NLTEDQRNAA IQSLRDDPSV SLEILGEAKK LNDQAQPK

SEQ ID NO 146 documento WO2018029158

10 IAAQHDKDHQ AAFYEILHLP NLTEEQRNAA IQSLRDDPSV SLEILAEAKK LNDQAQPK

SEQ ID NO 147 documento WO2018029158

IAAQHDKEQQ AAFYEILHLP NLTEDQRNAA IQSLRHDPSV SLEILGEAKK LNDQAQPK

SEQ ID NO 148 documento WO2018029158

IAAQHDKDQQ AAFYEILHLP NLTEEQRNAA IQSLRHDPSV SLEILAEAKK LNDQAQPK

15 Ligando de proteína L estable a los álcalis

El ligando de Proteína L estable a los álcalis puede comprender adecuadamente uno o más dominios de unión a IgG mutados de PpL. Los dominios PpL nativos son Dominio B1 (SEQ ID NO. 149), Dominio B2 (SEQ ID NO. 150), Dominio B3 (SEQ ID NO. 151), Dominio B4 (SEQ ID NO. 152), Dominio B5 (SEQ ID NO. 153), Dominio C1 (SEQ ID NO 168), Dominio C2 (SEQ ID NO 169), Dominio C3 (SEQ ID NO 170), Dominio C4 (SEQ ID NO 171) y Dominio D1 (SEQ ID NO 172). Las mutaciones pueden implicar la sustitución de uno o más residuos de asparagina por otros residuos de aminoácidos, pero también son posibles otras mutaciones. La estructura del ligando de Proteína L estable a los álcalis puede ser normalmente una proteína L'-(Dominio'-S')_n-T', donde L' es una secuencia líder de 1-10 aminoácidos que incluye el extremo N terminal, Dominio' es el dominio de unión a IgG (mutado), S' es una secuencia espaciadora de 1-15 aminoácidos opcional, n es 1-10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, p. ej., 3-7 o 4-6, y T' es una secuencia de cola de 0-10 aminoácidos, incluido el extremo C-terminal (si T' tiene al menos un residuo de aminoácido).

25 SEQ ID NO 149 Proteína L Dominio B1 documento WO2016096643A1

SEEEVTIKAN LIFANGSTQT AEFKGTFEKA TSEAYAYADT LKKDNGEYTV
DVADKGYTLN IKFAGKEKTP EE

SEQ ID NO 150 Proteína L Dominio B2 documento WO2016096643A1

PKEEVTIKAN LIYADGKTQT AEFKGTFEAA TAEAYRYADA LKKDNGEYTV
DVADKGYTLN IKFAGKEKTP EE

30 SEQ ID NO 151 Proteína L Dominio B3 documento WO2016096643A1

PKEEVTIKAN LIYADGKTQT AEFKGTFEAA TAEAYRYADL LAKENGKYTV
DVADKGYTLN IKFAGKEKTP EE

SEQ ID NO 152 Proteína L Dominio B4 documento WO2016096643A1

PKEEVTIKAN LIYADGKTQT AEFKGTFAEA TAEAYRYADL LAKENGKYTA
DLEDGGYTIN IRFAGKKVDE KPE

SEQ ID NO 153 Proteína L Dominio B5 documento WO2016096643A1

35 EKEQVTIKEN IYFEDGTVQT ATFKGTFAEA TAEAYRYADL LSKEHGKYTA
DLEDGGYTIN IRFAG

SEQ ID NO 168 Proteína L Dominio C1

PEEEVTIKAN LIFADGSTQN AEFKGTFKA VSDAYAYADA LKKDNGEYTV
DVADKGLTLN IKFAGKKEKP EE

SEQ ID NO 169 Proteína L Dominio C2

PKÈEVTIKVN LIFADGKTQT AEFKGTFEEA TAKAYAYADL LAKENGEYTA
DLEDGGNTIN IKFAGKETPETP EE

5 SEQ ID NO 170 Proteína L Dominio C3

PKÈEVTIKVN LIFADGKIQT AEFKGTFEEA TAKAYAYANL LAKENGEYTA
DLEDGGNTIN IKFAGKETPETP EE

SEQ ID NO 171 Proteína L Dominio C4

PKÈEVTIKVN LIFADGKTQT AEFKGTFEEA TAEAYRYADL LAKVNGEYTA
DLEDGGYTIN IKFAGKEQPGEN PG

SEQ ID NO 172 Proteína L Dominio D1

10 PKÈEVTIKAN LIFADGKTQT AEFKGTFEEA TAEAYRYADL LAKVNGEYTA
DLEDGGYTIN IKFAGKEQPGEN

El ligando de proteína L estable a los álcalis puede resistir la incubación con NaOH 0,1 M durante 100 x 10 min a 22+/- 2 °C con menos del 45 % de reducción en la capacidad de unión frente a IgG, en relación con la capacidad de unión de IgG antes de la incubación . Esto puede medirse adecuadamente acoplado el ligando a un chip de resonancia de plasmones superficiales (SPR), p. ej., a chips sensor Biacore CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) tal como se describe en el documento US20170334954, usando p. ej. química de acoplamiento NHS, y medición de la capacidad de unión de inmunoglobulina del chip en un instrumento Biacore (GE Healthcare Bio-Sciences AB), normalmente utilizando IgG humana policlonal, antes y después de la incubación del chip en NaOH 0,5 M durante ciclos de 100 x 10 min. Alternativamente, la estabilidad alcalina se puede definir de tal manera que la matriz de separación con los ligandos unidos covalentemente sea capaz de resistir la incubación con NaOH 0,5 M o 0,1 M durante 100 x 15 min a 22+/- 2 °C con menos del 20 % de reducción en capacidad de unión frente a IgG, en relación con la capacidad de unión de IgG antes de la incubación. La reducción de la capacidad de unión de IgG puede ser adecuadamente inferior al 15 %, como inferior al 10 % o inferior al 5 %. La valoración se puede realizar midiendo la capacidad dinámica de ruptura del 10 % (Qb10%) con un tiempo de residencia de 2,4 o 6 min, tal como se describe en el documento US20170334954.

25 Los ligandos de proteína L estables a los álcalis tal como se discutió anteriormente incluyen constructos L'-(Dominio'-S')_n-T' monoméricos y multiméricos de los siguientes dominios mutados, tal como se describe en los documentos WO2016096643A1, US20180305414 y WO2017191748A1.

SEQ ID NO 154 Proteína L Dominio B3(N10Q, N45A) documento WO2016096643A1

PKEEVTIKAQ LIYADGKTQT AEFKGTFEEA TAEAYRYADL LAKEAGKYTV
DVADKGYTLN IKFAGKEKTPEE

30 SEQ ID NO 155 Proteína L Dominio B3 (N45A, N60Q) documento WO2016096643A1

PKÈEVTIKAN LIYADGKTQT AEFKGTFEEA TAEAYRYADL LAKEAGKYTV
DVADKGYTLQ IKFAGKEKTPEE

SEQ ID NO 156 Proteína L Dominio B3(N10Q, N45A, N60Q) documento WO2016096643A1

PKÈEVTIKAQ LIYADGKTQT AEFKGTFEEA TAEAYRYADL LAKEAGKYTV
DVADKGYTLQ IKFAGKEKTPEE

SEQ ID NO 157 documento US20180305414

35 ETPEE PREEVTIRVN LIFADGRIQT AEFGRGTFEEA TAKAYAYANL LAKENGEYTA
DLEDGGNTIN IKFAG

SEQ ID NO 158 documento WO2017191748

VTIKAN LIFANGSTQT AEFKGTFEKA TSEAYAYADT LKKDHGEYTV DVADKGYTLN
IKFA

Ligando de proteína G estable a los álcalis

El ligando de Proteína G estable a los álcalis puede comprender adecuadamente uno o más dominios de unión a IgG mutados de SpG. Las mutaciones pueden implicar la sustitución de uno o más residuos de asparagina por otros residuos de aminoácidos, pero también son posibles otras mutaciones. La estructura del ligando de Proteína G estable a los álcalis puede ser normalmente una proteína Lⁿ-(Dominioⁿ-Sⁿ)-Tⁿ, donde Lⁿ es una secuencia líder de 1-10 aminoácidos que incluye el extremo N terminal, Dominioⁿ es el dominio de unión a IgG (mutado), Sⁿ es una secuencia espaciadora de 1-15 aminoácidos opcional, n es 1-10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, p. ej., 3-7 o 4-6, y Tⁿ es una secuencia de cola de 0-10 aminoácidos, incluido el extremo C-terminal (si Tⁿ tiene al menos un residuo de aminoácido).

- 10 Los ligandos de Proteína G estables a los álcalis tal como se discutió anteriormente incluyen constructos Lⁿ-(Dominioⁿ-Sⁿ)-Tⁿ monoméricos y multiméricos de los siguientes dominios mutados, tal como se describe en los documentos WO2018180204A1 y WO2018180205A1.

SEQ ID NO 159 documento WO2018180204 SEQ 1(N8D)

TTYKLILDGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD GEWYDDATK
TFTVTE

- 15 SEQ ID NO 160 documento WO2018180204 SEQ 1(N8L)

TTYKLILLGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD GEWYDDATK
TFTVTE

SEQ ID NO 161 documento WO2018180204 SEQ 4(N8I)

TTYKLILIGK TLTGYTTTIA VDAATAEKVL KQFANDNGVD GEWYDDATK TFTVTE

SEQ ID NO 162 documento WO2018180204 SEQ 4(N8K)

- 20 TTYKLILK GK TLTGYTTTIA VDAATAEKVL KQFANDNGVD GEWYDDATK TFTVTE

SEQ ID NO 163 documento WO2018180204 SEQ 4(N8L)

TTYKLILIGK TLTGYTTTIA VDAATAEKVL KQFANDNGVD GEWYDDATK TFTVTE

SEQ ID NO 164 documento WO2018180205 SEQ 3

TTYKLIVKGN TFSGETTTKA VDAETAKEAF KQYATANNVD GEWSYDDATK TFTVTE

- 25 SEQ ID NO 165 documento WO2018180205 SEQ 4

TTYKLIVKGN TFSGETTTKA IDAATAEKEF KQYATANGVD GEWSYDDATK TFTVTE

SEQ ID NO 166 documento WO2018180205 SEQ 11

TTYKLIVKGN TLTGYTTTIA VDAETAEEKAL KQFANENGVD GEWSYDDATK TFTVTE

SEQ ID NO 167 documento WO2018180205 SEQ 13

- 30 TTYRLVIKGV TLTGYTATIA VDAATAEQTL RQFANDNGIT GEWAYDTATK TFTVTE

Ejemplos

Matriz prototipo

- 35 Se prepararon aproximadamente 130 ml de un prototipo de matriz de Proteína A estable a los álcalis mediante el acoplamiento de un ligando hexamérico altamente estable a los álcalis que tiene la estructura L-(Dominio)₆-T, con L=AQGT (SEQ ID NO 142), Dominio = SEQ ID NO 11 y T= una cisteína C-terminal, a perlas de agarosa altamente reticuladas. Las perlas se activaron con epoxi con epíclorhidrina antes del acoplamiento y el acoplamiento se realizó tal como se describe en el documento US6399750. El contenido de ligando después del acoplamiento fue de 18 mg/ml de matriz. Después de la inmovilización, el gel se lavó dos veces con un volumen de gel de agua destilada.

Activación

Las partículas de soporte poroso utilizadas fueron perlas rígidas de agarosa reticulada de 62 micrómetros (volumen ponderado, d50V) de diámetro medio, preparadas según los métodos del documento US6602990, incorporado aquí como referencia en su totalidad, y con un tamaño de poro correspondiente a un valor K_{av} de cromatografía de filtración inversa en gel de 0,70 para dextrano de 110 kDa de Pm, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB 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 epíclorhidrina y la reacción evolucionó durante 2 horas. El gel activado se lavó con 10 volúmenes de sedimento de gel (GV) de agua.

Acoplamiento

A 20 ml de solución de ligando (50 mg/ml) en un tubo Falcon de 50 ml, se le añadió 169 mg de NaHCO_3 , 21 mg de Na_2CO_3 , 175 mg de NaCl y 7 mg de EDTA. El tubo Falcon se colocó sobre una mesa rodante durante 5-10 min y luego se añadieron 77 mg de DTE. La reducción prosiguió durante >45 min. A continuación, la solución de ligando se desalinizó en una columna PD10 empaquetada con Sephadex G-25. El contenido de ligando en la solución desalinizada se determinó midiendo la absorción UV a 276 nm.

El gel activado se lavó con 3-5 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM pH 8,6} y luego se acopló el ligando según el método descrito en el documento US6399750, incorporado aquí por referencia en su totalidad. Todos los tampones usados en los experimentos habían sido desgasificados con nitrógeno gas durante al menos 5-10 min.

Ejemplo 1 - Efecto de diferentes soluciones de lavado en la capacidad de unión de IgG de una matriz de separación por afinidad

Se preparó una suspensión de gel al 10 % a partir de 10 ml de torta de filtración de la matriz prototipo y se añadieron 90,0 ml de etanol al 20 % ($90 \times 0,97 = 87,3$ g) (la densidad del etanol al 20 % es de 0,97 g/ml). A continuación, la suspensión se dispensó en una placa de filtro de 96 pocillos (GE Healthcare) con un robot Gilson, 200 μl de suspensión/pocillo (20 μl de gel/pocillo). A continuación, la placa se drenó con vacío. Se selló el fondo de la placa de filtro y luego se pipetearon las soluciones para el estudio de compatibilidad en la placa de filtro, 200 μl /pocillo. A continuación, la placa se almacenó a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante la noche durante 18 h. Las soluciones se retiraron mediante vacío y los pocillos se lavaron aproximadamente $10 \times 200 \mu\text{l}$ con tampón de PBS, y el último drenaje se realizó mediante centrifugación de 500 g durante 1 min.

Después de la exposición a estos compuestos químicos, se sometió a prueba la capacidad de unión estática de la siguiente manera. Se preparó una solución de muestra de IgG diluyendo Gammanorm (Octapharma, IgG humana policlonal) 10 veces en tampón de PBS. Después de lavar/equilibrar en tampón de PBS, se cargaron 250 μl de muestra/pocillo y la placa se incubó en un agitador durante 60 minutos. Los pocillos se vaciaron con centrifugación en una placa UV y la cantidad de muestra de IgG no unida se detectó como absorbancias a 280 nm usando un lector UV después de la dilución 1:1 para garantizar que las absorbancias estuvieran dentro del rango lineal del lector. Las capacidades de unión estática se calcularon y dividieron por la capacidad de IgG estática del prototipo antes de la incubación.

Los datos se presentan en la Fig. 1, mostrando que ninguna de las soluciones de prueba, incluida NaOH 1 M, tuvo ningún efecto negativo sobre la capacidad de unión de IgG estática del prototipo.

Ejemplo 2 - Efecto de diferentes soluciones de lavado en la retirada de ligandos no unidos de una matriz de separación por afinidad

Se preparó una suspensión de gel al 10% (en agua) de la matriz prototipo como se indicó anteriormente, en una placa de filtración de 96 pocillos (GE Healthcare) con un robot Gilson, 200 μl de suspensión/pocillo (20 μl de gel/pocillo). A continuación, la placa se drenó con vacío. Se selló el fondo de la placa de filtro y luego se pipetearon las soluciones para el estudio de eficacia de lavado en la placa del filtro, 200 μl /pocillo. A continuación, la placa se almacenó a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante 1 hora con agitación a 1200 rpm. Las soluciones se retiraron usando centrifugación, 500 g, durante 1 min y la placa se preparó de nuevo con las soluciones para el estudio de eficacia de lavado como se indicó anteriormente. Las soluciones eluidas se sometieron a prueba mediante CL-EM (sistema Aquity UPLC de Water con una columna Zorbax 300SB-C8 de $2,1 \times 50$ mm y un instrumento Q-TOF MS Xevo G2 de Waters) para determinar la concentración de ligandos como corriente iónica total (TIC) y una curva de calibración preparada con ligando libre en solución. Los detalles para el método de CL-EM fueron:

Tampón A: ácido fórmico al 0,1 % y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05 % en agua MilliQ™

Tampón B: ácido fórmico al 0,1 % y TFA al 0,05 % en acetonitrilo:2-propanol 80:20

La columna se mantuvo a 60°C. Se inyectó un volumen de 10-50 μl de muestra dependiendo de la concentración de las muestras y los datos de EM se recogieron en el modo *Full MS Survey* tal como se proporciona en el método de EM.

Método de EM

Tiempo: 0-12 minutos

Polaridad: Positiva

Modo de analizador: Resolución

5 Intervalo m/z: 50-4000

Tiempo de barrido: 1 s

Energía de colisión: No

Análisis de datos y deconvolución de Pm

10 La determinación de Pm para cada pico en los cromatogramas se realizó mediante la función MaxEnt1 proporcionada en el software MassLynx.

Las muestras se neutralizaron tal como se muestra a continuación:

NaOH 0,5M y 1M: 150 µl de muestra + 20 µl de ditioneitol (DTT) 1M y Tris HCl 2M y ácido fórmico al 10 % + 2,5 µl de ácido fórmico

NaOH 0,1M: 200 µl de muestra+ 20 µl de DTT 1M y Tris-HCl 2 M

15 *NaOH 0,05M:* 200 µl de muestra+ 10 µl de DTT 2M y Tris-HCl 2 M

Ácido acético 0,5 M pH 2,5: 150 µl de muestra+ 15 µl de DTT 1 M y Tris 2 M pH 8,5 + 5 µl de NaOH al 50%

HAc 0,1M+EtOH al 40%: 200 µl de solución+ 20 µl de DTT 1 M+Tris-base 2 M (primer lavado después de que el NaOH tenga un pH de 13-14, por lo tanto, la preparación de la muestra se realiza de manera diferente: por ejemplo, 200 µl de muestra+ + 10 µl DTT1 M+ Tris HCl 2 M)

20 *HAc 0,5M+EtOH al 40%:* 200 µl de solución+ 20 µl de DTT 1 M + Tris-base 2 M + 2,5 µl de NaOH al 50%

NaAc 0,025M pH 5: 200 µl de muestra+ 20 µl de DTT 1 M y Tris-base 2 M

MQ: 200 µl de muestra+ 20 µl de DTT 1 M y Tris-HCl 2 M

Aparte de las muestras anteriores, el resto de las muestras tenían la misma preparación de muestra que para NaAc 0,025 M, es decir, 200 µl de muestra + 20 µL de DTT 1 M y Tris-base 2 M

25 Todas las muestras neutralizadas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y se inyectaron en CL-EM.

Los resultados se presentan en la Tabla 1, que muestra que NaOH 50-1000 mM es notablemente eficaz en comparación con todas las demás soluciones. Esto es sorprendente porque el ligando es estable a los álcalis y no se hidroliza en las condiciones utilizadas. <LOD (límite de detección) significa que no se pudo detectar ningún ligando eliminado por lavado.

30 Tabla 1. Resultados del cribado de soluciones de lavado

Compuesto químico	Concentración	Concentración de ligando (µg/ml)
Ácido acético (pH 2,5)	0,5 M	<LOD
Ácido acético/NaCl (pH 2,5)	0,5 M/150 mM	<LOD
Ácido acético/NaCl (pH 2,5)	0,5 M/500 mM	<LOD
Ácido acético/EtOH (pH 2,5)	0,5 M/20%	<LOD
Ácido acético/EtOH (pH 2,5)	0,5 M/40%	0,29
Acetato pH 5	0,1 M	<LOD
Acetato/NaCl pH 5	0,1 M/150 mM	<LOD
Acetato/NaCl pH 5	0,1 M/500 mM	<LOD
Acetato/2-propanol pH 5	0,1 M/30%	<LOD
Acetato/2-propanol pH 5	0,1 M/40%	<LOD

Tris/NaCl pH 8,5	0,1 M/150 mM	<LOD
Tris/NaCl pH 8,5	0,1 M/500 mM	<LOD
Tris/NaCl/EtOH pH 8,5	0,1 M/150 mM/20%	<LOD
Tris/NaCl/EtOH pH 8,5	0,1 M/150 mM/40%	0,05
Tris/EtOH pH 8,5	0,1 M/20%	0,01
Tris/EtOH pH 8,5	0,1 M/40%	0,02
Tris/2-propanol pH 8,5	0,1 M/30%	0,07
Tris/2-propanol pH 8,5	0,1 M/40%	0,12
Etanol	20%	0,004
Etanol	40%	0,05
Etanol	70%	<LOD
2-propanol	30%	<LOD
2-propanol	40%	<LOD
Clorhidrato de guanidina	6 M	<LOD
Hidróxido de sodio	0,1 M	14
Hidróxido de sodio	0,5 M	13
Hidróxido de sodio	1,0 M	16
MgCl	1 M	<LOD
CaCl	1 M	1
Agente reductor (en Tris pH 8,5)	100 mM	0,01
Agua MilliQ™		0,04
PBS		<LOD

Ejemplo 3: comparación de la eficacia de retirada entre soluciones de NaOH y soluciones de HAc/EtOH

La matriz prototipo se drenó en un embudo de filtro de vidrio (n.º 3) y se empaquetaron alícuotas de torta de filtración de 0,7 - 0,8 g (ml) en columnas de plástico vacías de 10 ml (PD-10, GE Healthcare). Después de la incubación durante ciclos de 10 minutos (5 ciclos, véase la tabla 2), se recogieron los eluatos y se analizaron las muestras mediante CL-EM tal como se indicó anteriormente. Para la retirada completa del líquido, la resina de cada columna se drenó aplicando una sobrepresión de aire a la columna usando una jeringa.

Tabla 2

Ciclo de lavado (10 minutos)	Agua Milli Q de referencia	NaOH 100 mM	NaOH 50 mM	Ácido acético 500 mM+EtOH al 40%	Ácido acético 100 mM+EtOH al 40%
<i>Cantidad de resina pesada, g</i>	0,707	0,650	0,793	0,675	0,736
<i>Volumen de solución de lavado ml en ciclo 1-5</i>	0,71	0,65	0,79	0,68	0,74

Los resultados se muestran en la Fig. 2 a), que confirma que tanto el NaOH 50 como el 100 mM son mucho más eficaces que el agua y las soluciones de HAc/EtOH.

El experimento se repitió con una configuración de 10 ciclos según la Tabla 3.

Tabla 3

Ciclo de lavado (10 minutos)	NaOH 50 mM	NaOH 100 mM	Ácido acético 500 mM+EtOH al 40%
<i>Cantidad de resina pesada, g</i>	0,829	0,833	0,955
<i>Volumen de solución de lavado en ml en el ciclo 1-10</i>	0,83	0,83	0,96

Los resultados de esta configuración se presentan en la Fig. 2 b) y muestran que se alcanzó un nivel de meseta muy cercano a cero después de 10 ciclos x 10 min con cualquiera de las soluciones de NaOH.

Se realizaron algunos experimentos adicionales con soluciones de NaOH 0,1 M que contenían etanol al 40% y prolongando los ciclos de lavado a 30 min en lugar de 10 min. Los resultados de estos experimentos no fueron significativamente diferentes de aquellos con NaOH 0,1 M en agua con un tiempo de ciclo de 10 min.

Ejemplo 4. - Lavado con NaOH seguido de lavados con HAc/EtOH y NaAc

El ejemplo 3 se repitió con una secuencia de 10 ciclos de lavado en NaOH 50 o 100 mM, 3 ciclos en HAc 100 mM + EtOH al 40% y 5 ciclos en NaAc 25 mM, pH 5, seguido de transferencia a una solución de almacenamiento de EtOH acuoso al 20%.

Solución de lavado / n.º de ciclo	Solución de lavado, ml	Tiempo min
<i>Cantidad de resina pesada, g</i>	3,00	
NaOH 50/100 mM n.º 1-10	3,00	10
Ácido acético 100 mM + EtOH al 40% n.º 11-13	3,00	10
NaAc 25 mM pH 5 n.º 14-18	3,00	10
EtOH al 20%	3,00	almacenamiento

Los resultados presentados en la Fig. 3 muestran que casi todo el ligando no unido se retiró en las etapas de NaOH, produciéndose una pequeña cantidad en la primera etapa de HAc/EtOH.

Ejemplo 5 - Fuga de ligando - comparación con HAc convencional y lavado con tampón

Método de prueba de fuga de ligando

Se empaquetaron 2,0 ml de sedimento en gel en una columna Tricorn 5/100 de 5x100 mm (GE Healthcare) con etanol al 20 % + NaCl 0,2 M como líquido de empaquetado y un flujo de empaquetado de 3,5 ml/min. La altura del lecho era de 9,7 cm. La columna se equilibró con NaH₂PO₄ 0,020 M, pH 7,0 (tampón A), cargado con solución de IgG humana policlonal de 16,65 CV 2 g/l (Octapharma Gammanorm) en tampón A con un tiempo de residencia de 6 min, seguido de un lavado durante 3CV con tampón A y la IgG se eluyó con 5 CV de glicina 0,1 M, pH 3,0 (tampón B) y se recogió el eluato para su posterior análisis con ELISA. El eluato que contenía IgG se combinó y la concentración de ligando que fuga en el combinado se midió mediante un inmunoensayo ELISA para Proteína A (Repligen n.º 9000-1).

La secuencia del Ejemplo 4 dio como resultado una matriz de separación con aproximadamente el mismo nivel de fuga (<30 ng de ligando por mg de IgG) que una matriz lavada con una secuencia de referencia que implicaba 12 ciclos x 10 min con HAc 0,5 M, 15 ciclos x 10 min con Tris 0,1 M/NaCl 0,15 M pH 8,5, 1 ciclo x 17 h con Tris 0,1 M/NaCl 0,15 M pH 8,5/EtOH al 20 %, 3 ciclos x 10 min con HAc 0,5 M, 5 ciclos x 10 min con Tris 0,1 M/ NaCl 0,15 M pH 8,5 y 10 ciclos x 10 min con agua destilada antes de transferir a una solución de almacenamiento de EtOH acuosa al 20%. El método NaOH implicó 18 ciclos x 10 min con un tiempo total de 3 h, en comparación con el método de referencia con 45 ciclos x 10 min + 1 x 17 h, es decir, con un tiempo total de 24,5 h (7,5 h + 17 h) .

Esta descripción escrita utiliza ejemplos para divulgar la invención, incluido el mejor modo, y también para permitir que cualquier experto en la técnica ponga en práctica la invención, incluida 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.

Lista de secuencias

<110> GE Healthcare BioProcess R&D AB

<120> UN MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE UNA MATRIZ DE SEPARACIÓN

<130> 320948-1

<160> 172

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 51

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

ES 2 923 115 T3

<400> 1

Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

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

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

Ala Pro Lys
50

<210> 2

<211> 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

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

<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

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 4

ES 2 923 115 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

<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

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 6

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

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

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

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

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 7

ES 2 923 115 T3

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

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

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

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

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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

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

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

ES 2 923 115 T3

<400> 10

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> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 11

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
50 55

15

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

25

<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

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 13

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 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> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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 Gln 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> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 16

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> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 18

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

<210> 19

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

5

<400> 19

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> 20

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

15

<400> 20

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> 21

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

25

<400> 21

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> 22

<211> 58

30

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 22

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

10 <210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 23

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

20

<210> 24

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 24

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

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

30

<210> 25
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 <400> 25
 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
 10
 <210> 26
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20 <400> 26
 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
 25 <210> 27
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 30 <400> 27
 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> 28
 <211> 58
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 10 <400> 28
 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> 29
 <211> 58
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 20 <400> 29
 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> 30
 25 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Dominio mutado de proteína A

 <400> 30

ES 2 923 115 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> 31

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 31

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> 32

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 32

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> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 33

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> 34

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 34

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

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> 35

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 35

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> 36

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 36

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> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 37

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> 38

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 38

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> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 58

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

15

<400> 40

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

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

<210> 41

20 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 41

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

30 <210> 42

<211> 58

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 42

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

10 <210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 43

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

20 <210> 44
 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 44

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

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> 45
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 <400> 45
 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> 46
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20 <400> 46
 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
 25
 <210> 47
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 30 <400> 47

ES 2 923 115 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> 48

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 48

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> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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 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> 50

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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 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> 51

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 51

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> 52

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 52

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> 53

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

5

<400> 53

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> 54

<211> 58

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

15

<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 Arg 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> 55

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<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 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

30

<210> 56

<211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

<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 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
 10 50 55

<210> 57
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

20 <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 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> 58
 <211> 58
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

30 <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 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> 59
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 <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 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
 10
 <210> 60
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20 <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 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
 25 <210> 61
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 30 <400> 61
 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> 62
 <211> 57
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 10 <400> 62
 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

 <210> 63
 <211> 57
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20
 <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 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

 <210> 64
 25 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Dominio mutado de proteína A

 <400> 64

ES 2 923 115 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 Ile Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 65

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 65

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

<210> 66

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 66

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> 67

<211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 67

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> 68

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 68

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> 69

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 69

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

<210> 70

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 70

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

<210> 71

<211> 62

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 71

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

<210> 72

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 72

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 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

<210> 73

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

5

<400> 73

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

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

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45
Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50

10

<210> 74

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 74

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

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

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50

20

<210> 75

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 75

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

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

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50

30

<210> 76

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

5

<400> 76

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

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

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

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

10

<210> 77

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 77

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

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

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

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50

20

<210> 78

<211> 55

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 78

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

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

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

30

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 79

<211> 58

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 79

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 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

10 <210> 80

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 80

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 Glu 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

20 <210> 81
 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 81

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 Arg 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

30

<210> 82
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 <400> 82
 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 Ile 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> 83
 <211> 58
 <212> PRT
 15
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20
 <400> 83
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Leu 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
 25
 <210> 84
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30
 <223> Dominio mutado de proteína A
 <400> 84
 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 Phe Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 85
 <211> 58
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 10 <400> 85
 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 Tyr Phe Ile Gln
 20 25 30

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

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

 <210> 86
 <211> 58
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 20 <400> 86
 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 Met Phe Ile Gln
 20 25 30

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

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

 <210> 87
 25 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Dominio mutado de proteína A

 <400> 87

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 Trp Phe Ile Gln
20 25 30

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

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

<210> 88

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 88

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 Val Phe Ile Gln
20 25 30

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

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

<210> 89

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 89

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 Thr Phe Ile Gln
20 25 30

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

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

<210> 90

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 90

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 Asp 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> 91

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 91

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 His Phe Ile Gln
20 25 30

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

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

15

<210> 92

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

25

<400> 92

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

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

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

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

<210> 93

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 93

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

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

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

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

<210> 94

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 94

Ala Asp Gly Lys Phe Glu 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 Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

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

<210> 95

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 95

Ala Asp Gly Lys Phe Glu 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 Lys
20 25 30

Ser Ile Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

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

<210> 96

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 96

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

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

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

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

<210> 97

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 97

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

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

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

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

<210> 98

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 98

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

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

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

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

<210> 99

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

5

<400> 99

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

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

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

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

<210> 100

10 <211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 100

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

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

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

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

20

<210> 101

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 101

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

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

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

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

30

<210> 102

<211> 59

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 102

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

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

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

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

10

<210> 103

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 103

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

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

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

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

20

<210> 104

<211> 59

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 104

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

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

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

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

<210> 105
 <211> 59
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 10 <400> 105
 Val Asp Asn Ala Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu
 1 5 10 15

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

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

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

 <210> 106
 <211> 59
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 20 <400> 106
 Val Asp Asn Met Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu
 1 5 10 15

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

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

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

 <210> 107
 25 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Dominio mutado de proteína A

 <400> 107
 Val Asp Asn Asp Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu
 1 5 10 15

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

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

ES 2 923 115 T3

	35	40	45
	Ala Lys Lys Leu Asn Asp	Ala Gln Ala Pro Lys	
	50	55	
	<210> 108		
	<211> 59		
5	<212> PRT		
	<213> Dominio mutado de proteína A		
	<400> 108		
	Val Asp Asn Trp Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu		
	1	5	10 15
	Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile		
	20	25	30
	Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu		
	35	40	45
	Ala Lys Lys Leu Asn Asp	Ala Gln Ala Pro Lys	
	50	55	
10	<210> 109		
	<211> 59		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Dominio mutado de proteína A		
	<400> 109		
	Val Asp Asn Glu Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu		
	1	5	10 15
	Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile		
	20	25	30
	Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu		
	35	40	45
	Ala Lys Lys Leu Asn Asp	Ala Gln Ala Pro Lys	
	50	55	
20	<210> 110		
	<211> 59		
	<212> PRT		
25	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Dominio mutado de proteína A		
30	<400> 110		

ES 2 923 115 T3

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

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

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

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

<210> 111

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 111

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

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

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

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

<210> 112

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 112

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 His 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> 113

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 113

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 Ser 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> 114

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 114

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Ser 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> 115

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 115

Val Asp His 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 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> 116

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 116

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

Leu His Leu Pro Asn Leu Ser 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> 117

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 117

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 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 Lys
50 55

<210> 118

<211> 57

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 118

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

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

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

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 119

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 119

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala 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> 120

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 120

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Lys 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> 121

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 121

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala 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 Thr Ala
35 40 45

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

<210> 122

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

5

<400> 122

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala 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 Thr 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> 123

10 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 123

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala 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 Ala 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> 124

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 124

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

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

30

<210> 125

<211> 58

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Dominio mutado de proteína A

<400> 125

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

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

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

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

10 <210> 126

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 126

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala 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 Thr Ala
 35 40 45

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

20

<210> 127

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 127

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr 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 Thr Ala
 35 40 45

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

30

<210> 128
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 <400> 128
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Trp 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
 10
 <210> 129
 <211> 58
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20 <400> 129
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Leu 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
 25
 <210> 130
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Dominio mutado de proteína A
 <400> 130
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Glu 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> 131
 <211> 58
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A

 10 <400> 131
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Lys 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> 132
 <211> 58
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Dominio mutado de proteína A
 20
 <400> 132
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Val 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> 133
 25 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Dominio mutado de proteína A

 <400> 133

ES 2 923 115 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 Arg Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

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

<210> 134

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 134

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

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> 135

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 135

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn 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

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

<210> 136

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 136

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

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

<210> 137

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 137

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

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> 138

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 138

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> 139

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 139

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 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> 140

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 140

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 Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Ala 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> 141

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio mutado de proteína A

<400> 141

Val Asp Asn Gly 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 Ala Ala 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> 142

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia líder

<400> 142

5 Ala Gln Gly Thr

1

<210> 143

<211> 58

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> dominio de proteína A mutante

<400> 143

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

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

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

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

<210> 144

20 <211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> dominio de proteína A mutante

<400> 144

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

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

30

<210> 145

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> dominio de proteína A mutante

<400> 145

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

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

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

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

<210> 146

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína A mutante

<400> 146

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp His 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

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

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

<210> 147

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína A mutante

<400> 147

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

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

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

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

<210> 148

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína A mutante

<400> 148

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp 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

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

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

5 <210> 149

<211> 72

<212> PRT

<213> Peptostreptococcus magnus

10 <400> 149

Ser Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser
 20 25 30
 Glu Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr
 35 40 45

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

Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
 65 70

15 <210> 150

<211> 72

<212> PRT

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 150

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr
 35 40 45

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

20 Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
 65 70

<210> 151

<211> 72

<212> PRT

25 <213> Peptostreptococcus magnus

<400> 151

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr
 35 40 45

Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala
 50 55 60
 Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
 65 70

5 <210> 152

<211> 73

<212> PRT

<213> Peptostreptococcus magnus

10 <400> 152

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr
 35 40 45

Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala
 50 55 60

Gly Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu
 65 70

<210> 153

<211> 65

15 <212> PRT

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 153

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

Thr Val Gln Thr Ala Thr Phe Lys Gly Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ser Lys Glu His Gly Lys Tyr
 35 40 45

Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala
 50 55 60

Gly
 65

20

<210> 154

<211> 72

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> dominio de proteína L mutante

<400> 154

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Gln Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Ala Gly Lys Tyr
35 40 45

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

Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
65 70

10 <210> 155

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> dominio de proteína L mutante

<400> 155

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Ala Gly Lys Tyr
35 40 45

Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Gln Ile Lys Phe Ala
50 55 60

Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
65 70

20 <210> 156

<211> 72

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> dominio de proteína L mutante

<400> 156

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Gln Leu Ile Tyr Ala Asp Gly
1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Ala Gly Lys Tyr
35 40 45

Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Gln Ile Lys Phe Ala
50 55 60

Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu
65 70

<210> 157

<211> 70

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína L mutante

<400> 157

Glu Thr Pro Glu Glu Pro Arg Glu Glu Val Thr Ile Arg Val Asn Leu
1 5 10 15

Ile Phe Ala Asp Gly Arg Ile Gln Thr Ala Glu Phe Arg Gly Thr Phe
20 25 30

Glu Glu Ala Thr Ala Lys Ala Tyr Ala Tyr Ala Asn Leu Leu Ala Lys
35 40 45

Glu Asn Gly Glu Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Asn Thr Ile
50 55 60

Asn Ile Lys Phe Ala Gly
65 70

<210> 158

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína L mutante

<400> 158

Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser Thr Gln Thr
1 5 10 15

Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu Ala Tyr Ala
20 25 30

Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val
35 40 45

Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala
50 55 60

<210> 159
 <211> 56
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> dominio de proteína L mutante

 10 <400> 159
 Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr
 1 5 10 15

 Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln
 20 25 30

 Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
 35 40 45

 Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
 50 55

 <210> 160
 <211> 56
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> dominio de proteína G mutante
 20
 <400> 160
 Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Leu Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr
 1 5 10 15

 Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln
 20 25 30

 Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
 35 40 45
 Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
 50 55

 25 <210> 161
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> dominio de proteína G mutante

 <400> 161

ES 2 923 115 T3

Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Ile Gly Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Thr Thr Ile Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Leu Lys Gln
20 25 30

Phe Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
35 40 45

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 162

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína G mutante

<400> 162

Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Lys Gly Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Thr Thr Ile Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Leu Lys Gln
20 25 30

Phe Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
35 40 45

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 163

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína G mutante

<400> 163

Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Ile Gly Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Thr Thr Ile Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Leu Lys Gln
20 25 30

Phe Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
35 40 45

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 164

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína G mutante

<400> 164

Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr
1 5 10 15

Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln
20 25 30

Tyr Ala Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala
35 40 45

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

5 <210> 165

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> dominio de proteína G mutante

<400> 165

Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr
1 5 10 15

Thr Thr Lys Ala Ile Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln
20 25 30
Tyr Ala Thr Ala Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala
35 40 45

15 Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 166

<211> 56

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína G mutante

25 <400> 166

Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Leu Thr Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Thr Thr Ile Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Leu Lys Gln
20 25 30

Phe Ala Asn Glu Asn Gly Val Tyr Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala
35 40 45

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 167

<211> 56

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> dominio de proteína G mutante

<400> 167

Thr Thr Tyr Arg Leu Val Ile Lys Gly Val Thr Leu Thr Gly Tyr Thr
1 5 10 15

Ala Thr Ile Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Gln Thr Leu Arg Gln
20 25 30

Phe Ala Asn Asp Asn Gly Ile Thr Gly Glu Trp Ala Tyr Asp Thr Ala
35 40 45

Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
50 55

<210> 168

<211> 72

<212> PRT

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 168

Pro Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly
1 5 10 15

Ser Thr Gln Asn Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Ala Lys Ala Val Ser
20 25 30

Asp Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr
35 40 45

Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Leu Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala
50 55 60

Gly Lys Lys Glu Lys Pro Glu Glu
65 70

<210> 169

<211> 74

<212> PRT

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 169

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Val Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly
1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
20 25 30

Lys Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Glu Tyr
35 40 45

Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Asn Thr Ile Asn Ile Lys Phe Ala
50 55 60

Gly Lys Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Glu
65 70

<210> 170

<211> 74

<212> PRT

<213> *Peptostreptococcus magnus*

<400> 170

5 Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Val Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly
 1 5 10 15
 Lys Ile Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Lys Ala Tyr Ala Tyr Ala Asn Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Glu Tyr
 35 40 45

Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Asn Thr Ile Asn Ile Lys Phe Ala
 50 55 60

Gly Lys Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Glu
 65 70

<210> 171

<211> 74

10 <212> PRT

<213> *Peptostreptococcus magnus*

<400> 171

Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Val Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Val Asn Gly Glu Tyr
 35 40 45

Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr Thr Ile Asn Ile Lys Phe Ala
 50 55 60

Gly Lys Glu Gln Pro Gly Glu Asn Pro Gly
 65 70

<210> 172

<211> 72

<212> PRT

15 <213> *Peptostreptococcus magnus*

<400> 172

20 Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Val Asn Gly Glu Tyr
 35 40 45

Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr Thr Ile Asn Ile Lys Phe Ala
 50 55 60

Gly Lys Glu Gln Pro Gly Glu Asn
 65 70

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una matriz de separación que comprende ligandos estables a los álcalis acoplados covalentemente derivados de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana y que está sustancialmente libre de ligandos acoplados de forma no covalente derivados de dicha proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana, que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar un soporte sólido y un ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana, en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana es un ligando de Proteína A estable a los álcalis, un ligando de Proteína L estable a los álcalis, o un ligando de proteína G estable a los álcalis;
 - b) hacer reaccionar dicho ligando estable a los álcalis con dicho soporte sólido para formar una matriz de separación que tiene ligandos estables a los álcalis acoplados covalentemente; y
 - c) lavar dicha matriz de separación que tiene ligandos estables a los álcalis acoplados covalentemente, en donde cualquier lavado tras la reacción en la etapa b), para retirar el ligando no unido, consiste en una etapa de lavado con una solución de lavado que comprende al menos 50 mM de un hidróxido de metal alcalino, tal como NaOH o KOH o cualquier mezcla de los mismos,
 en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana es capaz de resistir la incubación con NaOH 0,1 M durante 100x10 min a 22 +/-2 °C con menos del 45% de reducción en la capacidad de unión frente a IgG.
2. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho soporte sólido comprende una pluralidad de partículas de soporte, tal como una pluralidad de partículas de soporte porosas.
3. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa c) se repite al menos una vez, opcionalmente se repite al menos 5 veces.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además, después de la etapa c), una etapa d) de transferir dicha matriz de separación a una solución de almacenamiento.
5. El método de la reivindicación 4, que comprende además, después de la etapa d), una etapa de dispensar dicha matriz de separación en contenedores de transporte.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa c) se realiza en el plazo de 24 h tras la etapa b).
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa c) la solución de lavado comprende 25 mM – 1 M de un hidróxido de metal alcalino, tal como NaOH o KOH o cualquier mezcla de los mismos.
8. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa c) la solución de lavado comprende 40 mM – 1 M de un hidróxido de metal alcalino, tal como 90 mM - 0,5 M de un hidróxido de metal alcalino, o 50 - 200 mM de un hidróxido de metal alcalino.
9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa c) la solución de lavado comprende NaOH o KOH 40 mM - 1 M, tal como NaOH o KOH 90 mM - 0,5 M, o NaOH o KOH 50 - 200 mM.
10. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa c) la matriz de separación se incuba con la solución de lavado durante 2-60 min, tal como 5-30 min.
11. El método de la reivindicación 10, en donde, tras la incubación, la solución de lavado se retira por filtración.
12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa c) la temperatura es de 2-40 °C, tal como de 15-30 °C o de 20-25 °C.
13. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además, antes de la etapa b), una etapa a') de activación de dicho soporte sólido.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la etapa a') comprende la formación de grupos aldehído sobre dicho soporte sólido, o en donde la etapa a') comprende la formación de grupos epóxido sobre dicho soporte sólido.
15. El método de la reivindicación 13, en donde tras la etapa b), dicha matriz de separación comprende grupos epóxido residuales.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende residuos de lisina capaces de reaccionar con dichos grupos aldehído o epóxido.

17. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde el ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende un residuo de cisteína con un tiol capaz de reaccionar con dichos grupos epóxido.
- 5 18. El método de la reivindicación 17, en donde dicho residuo de cisteína está próximo a un extremo C-terminal o un extremo N-terminal de dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana.
19. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana es capaz de resistir la incubación con NaOH 0,5 M durante 100 x 10 min a 22+/- 2 °C con una reducción de menos del 45 % en capacidad de unión frente a IgG.
- 10 20. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende al menos un dominio de Proteína A estable a los álcalis, y opcionalmente en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende un multímero de dominios de Proteína A estables a los álcalis.
- 15 21. El método de la reivindicación 20, en donde dicho multímero comprende al menos cuatro dominios de Proteína A estables a los álcalis, o en donde dicho multímero comprende al menos seis dominios de Proteína A estables a los álcalis.
22. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho ligando estable en álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende al menos un dominio de Proteína L estable a los álcalis, o en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende un multímero de dominios de Proteína A estables a los álcalis, o en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende al menos un dominio de Proteína G estable a los álcalis.
- 20 23. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho ligando estable a los álcalis derivado de una proteína de unión a inmunoglobulina bacteriana comprende un multímero de dominios de Proteína G estables a los álcalis.
- 25 24. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho soporte sólido comprende un polisacárido reticulado.
25. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho soporte sólido comprende agar o agarosa reticulados.
26. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicha matriz de separación comprende al menos 11 mg de ligando unido covalentemente por ml de matriz, tal como al menos 15 mg de ligando unido covalentemente por ml de matriz.
- 30 27. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde tras la etapa c), dicha matriz de separación produce una fuga de ligando de menos de 40 ng de ligando por mg de IgG, medido mediante un ensayo ELISA en un combinado de eluatos de IgG.

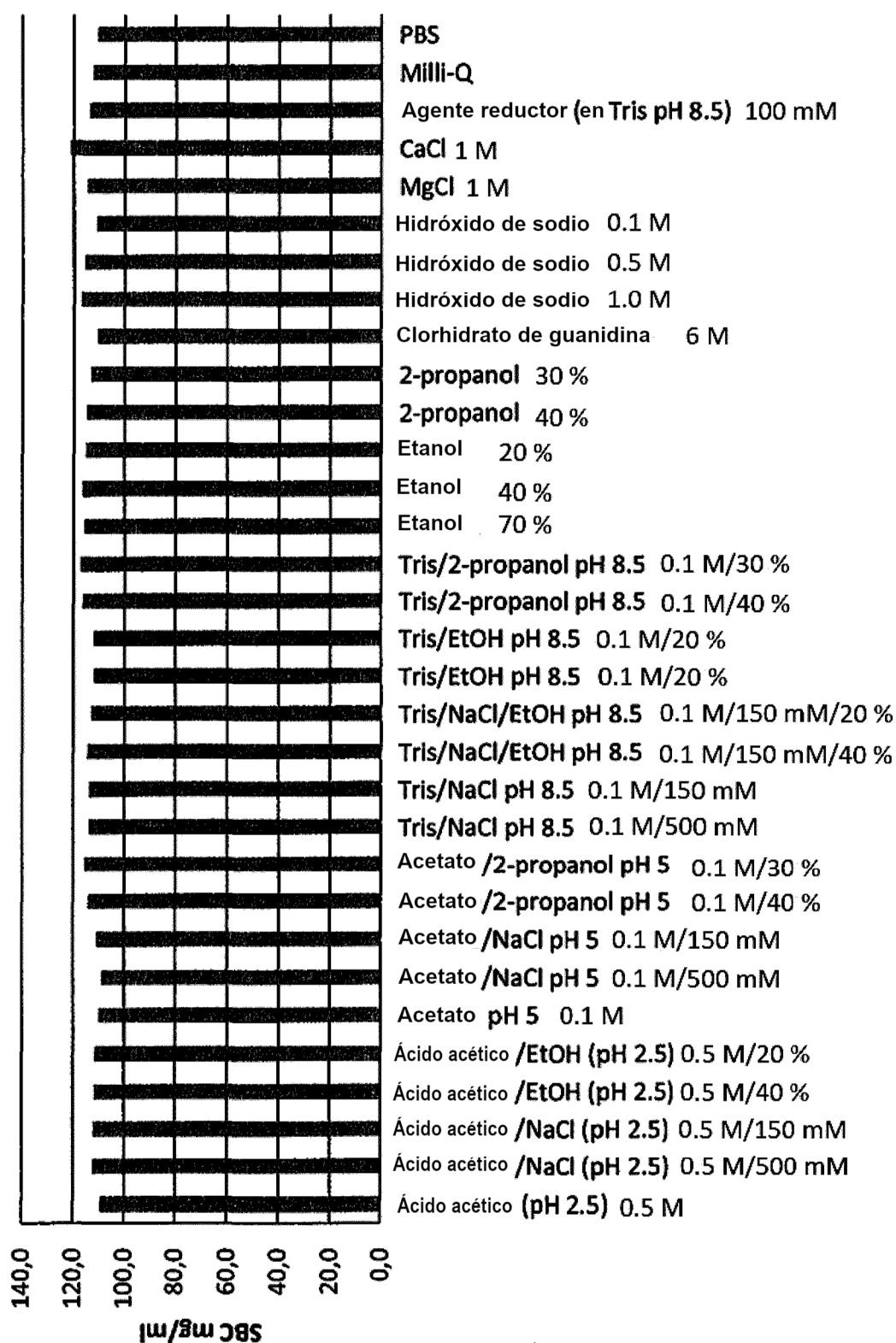


Fig. 1.

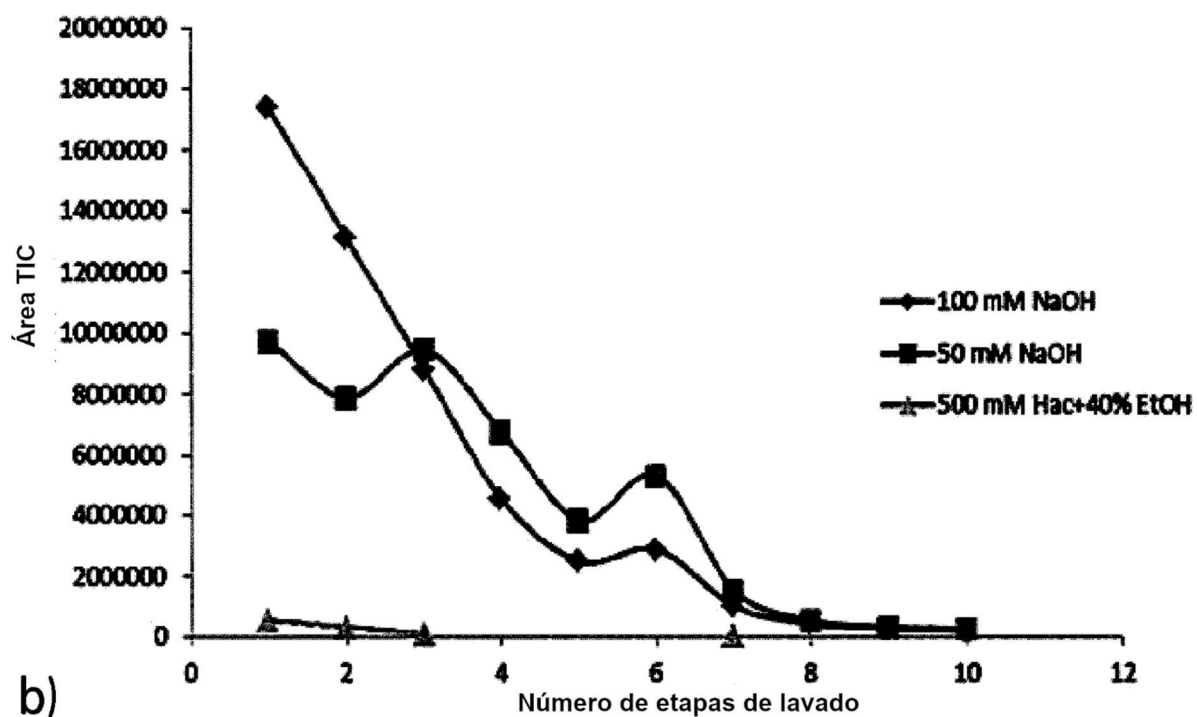
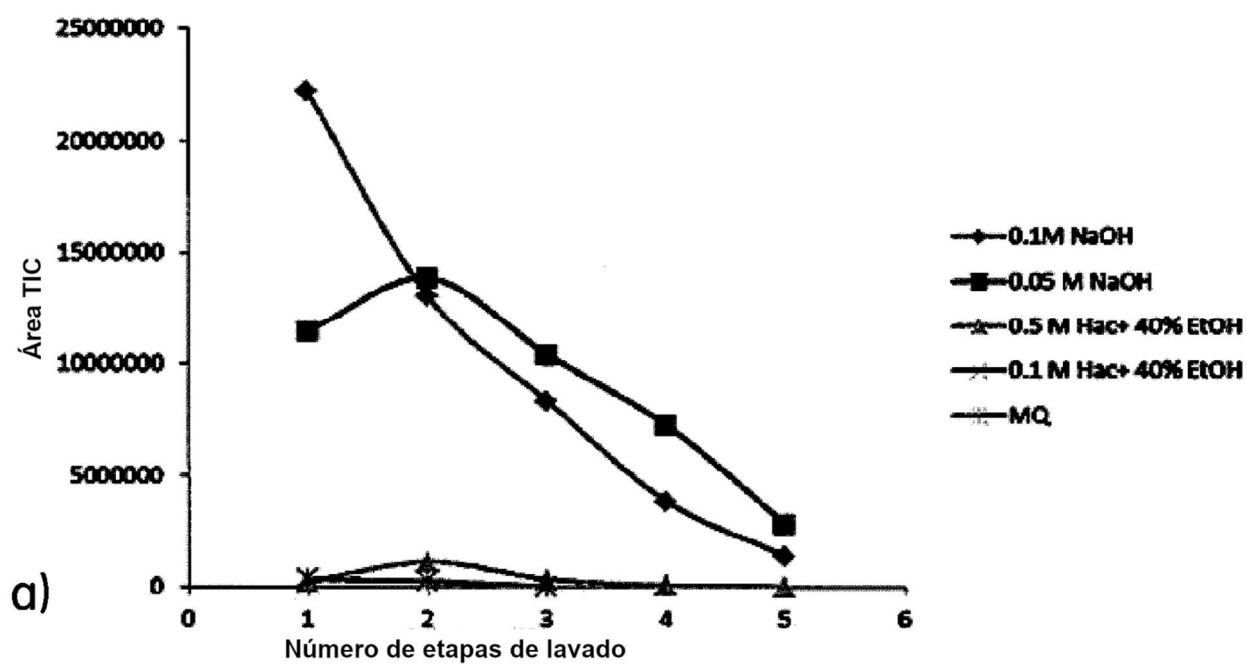


Fig. 2.

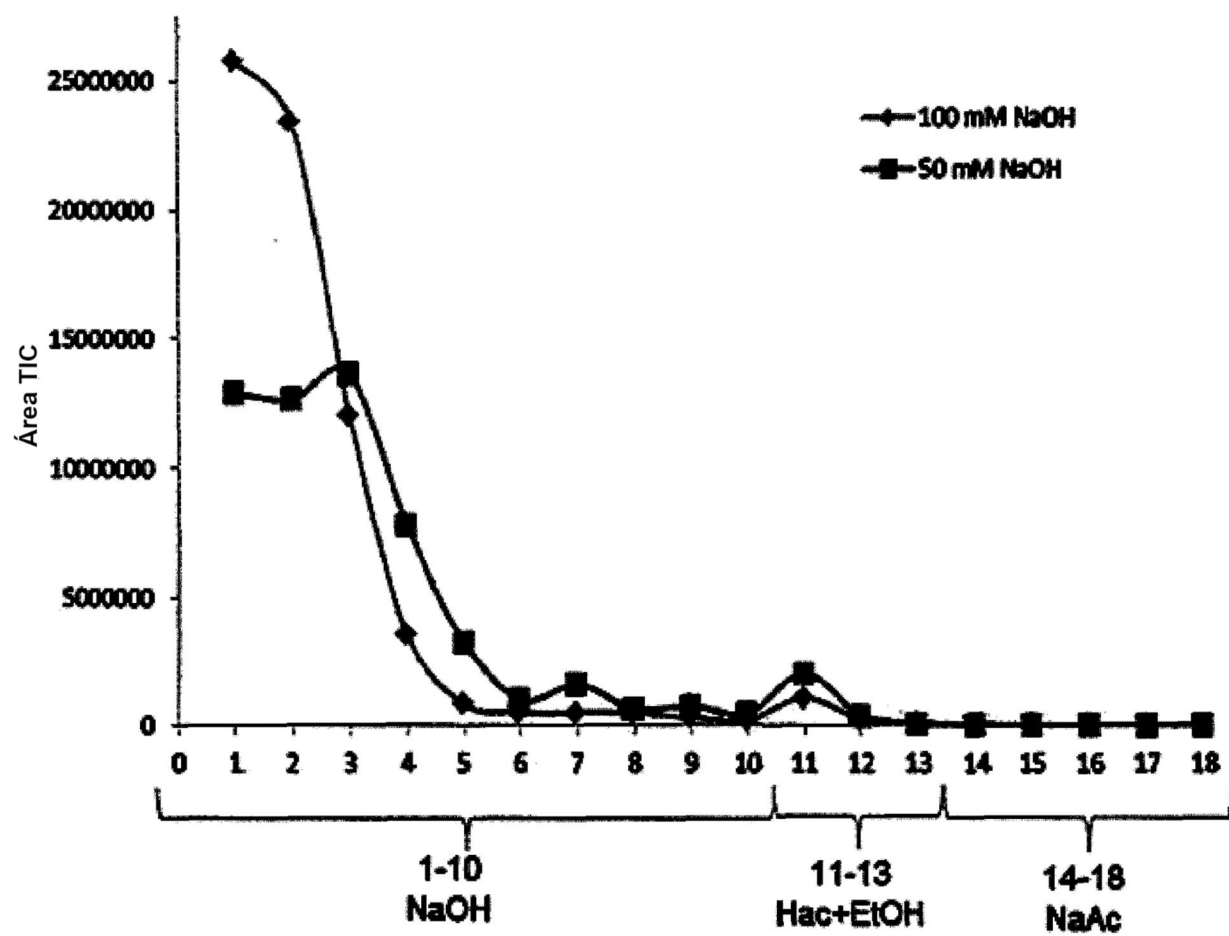


Fig. 3.