



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117769562 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 26

(21) 申请号 202280051543.9

S • 高斯 李正剑

(22) 申请日 2022.07.18

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

专利代理师 凌翠 郑霞

63/223,792 2021.07.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.01.22

C07K 14/31 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/06 (2006.01)

PCT/US2022/073822 2022.07.18

C07K 5/01 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 1/22 (2006.01)

W02023/004273 EN 2023.01.26

C07K 1/303 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

(71) 申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

申请人 百时美施贵宝公司

(72) 发明人 崔宏刚 李奕 戴维 • 斯特恩

权利要求书1页 说明书17页

徐晖阔 陆丽琳 杰森 • 米尔斯

序列表 (电子公布) 附图7页

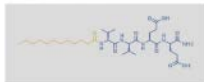
(54) 发明名称

用于结合触发的抗体沉淀和纯化的高亲和力超分子聚合物

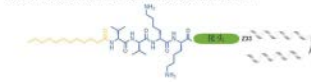
(57) 摘要

本公开内容涉及用于纯化包含Fc区的蛋白诸如抗体或Fc融合蛋白的系统和方法。所述系统包括一个或多个填充物分子以及一个或多个配体分子,所述填充物分子包含缀合至肽氨基酸序列的线性烃链,所述一个或多个配体分子包含线性烃链、肽氨基酸序列、接头和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A的Z33肽。填充物分子和配体分子在生理条件下自组装成免疫纤维(IF)。

A 填充物分子: C12-VVEE



配体分子: C12-VVKKI接头Z33



1. 一种系统, 包括:

(a) 一个或多个填充物分子, 所述一个或多个填充物分子包含缀合至2-5个氨基酸的氨基酸序列的线性烃链;

(b) 一个或多个配体分子, 所述一个或多个配体分子包含线性烃链、2-5个氨基酸的氨基酸序列、接头和缀合至所述接头的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白A的Z33肽或其抗体结合片段, 其中所述一个或多个填充物分子和所述一个或多个配体分子具有在生理条件下自组装成免疫纤维 (IF) 的能力。

2. 根据权利要求1所述的系统, 其中所述Z33肽包含氨基酸序列FNMQQRRFYALHDPNLN EEQRNAKIKSIRDD (SEQ ID NO:1)。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的系统, 其中所述一个或多个填充物分子和所述一个或多个配体分子中的每一个包含长度为12个碳原子的线性烃链。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的系统, 其中所述一个或多个填充物分子和所述一个或多个配体分子中的每一个包含氨基酸序列VVXX (SEQ ID NO:2)。

5. 根据权利要求4所述的系统, 其中所述填充物分子包含氨基酸序列VVEE (SEQ ID NO:3)。

6. 根据权利要求4所述的系统, 其中所述配体分子包含氨基酸序列VVKK (SEQ ID NO:4)。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的系统, 其中所述接头包含一个或多个寡(乙二醇) (OEG) 分子。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的系统, 其中所述接头包含一个或多个聚乙二醇 (PEG) 分子。

9. 根据权利要求7或权利要求8所述的系统, 其中所述接头包含2-50个OEG或PEG分子。

10. 根据权利要求9所述的系统, 其中所述接头包含36个OEG或PEG分子。

11. 根据权利要求9所述的系统, 其中所述接头包含16个OEG或PEG分子。

12. 一种用于纯化包含抗体的Fc区的蛋白的方法, 所述方法包括

(a) 将权利要求1-11中任一项所述的系统溶解在生理pH的水性溶液中并老化过夜, 由此使所述一个或多个填充物分子和一个或多个配体分子自组装成免疫纤维 (IF);

(b) 将包含含有Fc区的蛋白的样品与所述IF在由此所述IF与所述Fc区结合的条件下混合以在溶液中形成免疫纤维-蛋白复合物;

(c) 通过添加盐和/或进行离心从所述溶液中分离所述免疫纤维-蛋白复合物; 并且

(d) 使所述IF与所述包含Fc区的蛋白解离。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述包含Fc区的蛋白是抗体。

14. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述包含Fc区的蛋白是Fc融合蛋白。

15. 根据权利要求12-14中任一项所述的方法, 其中通过将pH降低至洗脱条件并进行过滤或微滤来使所述IF与所述包含Fc区的蛋白解离。

16. 根据权利要求12-15中任一项所述的方法, 所述方法在30分钟或更短时间内完成。

用于结合触发的抗体沉淀和纯化的高亲和力超分子聚合物

[0001] 本申请要求2021年7月20日提交的美国临时专利申请系列第63/223,792号的优先权,该专利申请通过引用以其整体并入本文。

[0002] 通过引用并入的电子提交的材料

[0003] 附随提交的标题为“JHU-39610-601_SQL”、创建于2022年7月18日的、具有5,022字节文件大小的计算机可读序列列表的文本通过引用以其整体特此并入。

[0004] 背景

[0005] 超分子组装是构建层级和功能纳米结构的自下而上方法。在最近开发的超分子聚合物中,基于肽的材料因其生物相容性、生物可降解性和低毒性而特别有吸引力。生物活性表位在超分子基底上的呈递能够实现主动靶向纳米结构,用于有效的分子/细胞识别和信号传导,以及治疗剂在期望部位处的精确递送和积累。鉴于将这些表位锚定在超分子聚合物表面所引入的空间位阻,表位的空间排列在调节其功能方面起着重要作用。生物活性构建单元与惰性分子的共组装已被显示能有效调节表位密度并实现增强的生物活性。同时,使用柔性接头用于在所得纳米结构的径向的方向上间隔开表位对于改进表位的可及性及其与靶生物分子的相互作用同样重要。

[0006] 由于常规的基于蛋白A的亲亲和层析方法受有限的生产能力和高培养基成本影响,已越来越多地探索亲和沉淀作为蛋白A层析的有希望的替代方法,用于纯化单克隆抗体(mAb)和其他治疗性蛋白。在纯化过程期间,使用盐来触发或帮助抗体的沉淀是普遍的。然而,已知高盐浓度增加蛋白不稳定和存在于溶液中的杂质的非特异性沉淀的风险。

[0007] 对于更有效的用于捕获和纯化抗体和其他蛋白的系统和方法仍然存在需求。

[0008] 本公开内容的简述

[0009] 本公开内容提供了一种系统,所述系统包括:(a)一个或多个填充物分子(filler molecules),其包含缀合至2-5个氨基酸的氨基酸序列的线性烃链;(b)一个或多个配体分子,其包含线性烃链、2-5个氨基酸的氨基酸序列、接头和缀合至所述接头的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A的Z33肽或其抗体结合片段,其中所述一个或多个填充物分子和一个或多个配体分子具有在生理条件下自组装成免疫纤维(IF)的能力。还提供了使用上述系统纯化抗体和/或融合Fc蛋白的方法。

[0010] 附图简述

[0011] 图1A-图1C包括图示具有OEG(或PEG)接头的免疫纤维(IF)构建单元的分子设计和用于单克隆抗体(mAb)捕获的IF的形成的示意图。图1A示出了填充物分子C12-VVEE和配体分子C12-VVKK[接头]Z33的化学结构。图1B是图示具有不同接头的配体分子设计以及接头长度对Z33肽在共组装IF上呈递的影响的示意图。图1C图示了填充物和配体分子共组装成超分子IF以及mAb在IF溶液中的四种可能状态:(1)mAb的两个Fc部分与来自两个不同IF的两个配体结合;(2)mAb的两个Fc部分与来自同一IF的两个相邻配体结合;(3)mAb的一个Fc部分与IF上的一个配体结合;(4)溶液中与零个、一个或两个未组装成IF的单体配体结合的游离mAb。

[0012] 图2A-图2H示出了填充物和配体分子的表征。图2A-图2G是PBS中自组装的填充物

和配体分子(图2A:C12-VVEE;图2B:04;图2C:08;图2D:012;图2E:016;图2F:036;和图2G:P2000)的代表性TEM图像,其直径分别为 $7.4 \pm 0.6\text{nm}$ 、 $11.1 \pm 0.9\text{nm}$ 、 $12.6 \pm 1.2\text{nm}$ 、 $13.6 \pm 1.2\text{nm}$ 、 $14.9 \pm 1.3\text{nm}$ 、 $18.5 \pm 1.8\text{nm}$ 和 $19.3 \pm 2.0\text{nm}$ 。直径以平均值 $\pm$ SD给出($n=30$)。比例尺:100nm。图2H是图示具有不同OEG(或PEG)接头的自组装的配体分子的归一化CD光谱的图,表明 α -螺旋二级结构的形成和保留。

[0013] 图3A-图3D是图示在25℃在pH 7.4的PBS中,将100 μM mAb1逐步注入到40 μM 04(图3A)、08(图3B)、012(图3C)、016(图3D)中的ITC谱和结合曲线的图。

[0014] 图4A-图4E示出了具有不同配体分子的IF的mAb沉淀性能的比较。图4A和图4B分别是图示在1M盐或无盐条件下与不同共组装的IF(2.5mM填充物、100 μM 配体)一起孵育的20 μM 和40 μM mAb1的mAb沉淀收率的图。图4A中含1M盐的G2的数据点是根据参考文献重新绘制的。图4C和图4D是图示在1M盐或无盐条件下与不同100IF(2.5mM填充物、100 μM 配体)一起孵育的20 μM (0.3mg)(图4C)和40 μM (0.6mg)(图4D)mAb 1的100 μL 样品的沉淀的mAb质量的图。图4E包括在1M盐或无盐条件下与40 μM mAb混合5分钟之后共组装的IF(2.5mM填充物、100 μM 配体)的照片。所有实验一式三份进行,并且数据显示为平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0015] 图5A-图5F示出了mAb沉淀收率的优化。图5A和图5B分别是图示以40 μM (0.6mg)、80 μM (1.2mg)和133 μM (2mg)的100 μL mAb1与以不同016浓度的IF一起孵育的mAb沉淀的收率和质量的图。图5C是图示在1M盐和无盐条件下与优化的IF(2.5mM填充物、250 μM 016)一起孵育的40 μM mAb1的mAb沉淀收率的比较的图。图5D是示出对于固定的mAb浓度,随着配体浓度的增加,mAb-IF凝聚的提议机制的示意图。状态3、状态1和状态2处的mAb分别在低、中和高配体浓度占优势。图5E是示出具有优化的IF(2.5mM填充物、250 μM 016)的40 μM mAb在2小时内的浊度的图。图5F是示出结合时间对与优化的IF(2.5mM填充物、250 μM 016)一起孵育的40 μM mAb1的mAb沉淀收率的影响的图。所有实验一式三份进行,并且数据显示为平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0016] 图6A-图6F示出了从澄清的批量细胞培养物收获物(缩写为“mAb CB”)中纯化mAb和以高滴度分离mAb。图6A是使用在PBS溶液中的IF进行mAb纯化过程的示意图。图6B是示出在无盐条件下连续两次沉淀之后40 μM 和80 μM 纯mAb1的mAb沉淀收率、在洗涤步骤的收率损失和洗脱收率的图。图6C是示出在无盐条件下用IF溶液连续两次沉淀之后40 μM 和80 μM mAb1 CB的mAb沉淀收率的图。图6D是使用冻干粉末形式的固体IF的高滴度mAb纯化过程的示意图。图6E和图6F是示出在无盐条件下使用冻干的IF连续沉淀的21mg/mL(图6E)和31mg/mL(图6F)纯mAb1的沉淀收率的图。所有实验一式三份进行,并且数据显示为平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0017] 图7是示出以10 μM 和20 μM 的100 μL mAb1与100 μL IF在不同016浓度一起孵育之后的mAb沉淀收率的图。对于两种mAb浓度,具有200 μM 016的IF给出最好的mAb沉淀收率。

[0018] 定义

[0019] 为了便于理解本发明技术,一些术语和措辞定义如下。另外的定义在整个详细描述中阐述。

[0020] 术语“核酸”、“多核苷酸”、“核苷酸序列”和“寡核苷酸”在本文中可互换使用,并分别指嘧啶和/或嘌呤碱基,优选地胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以及腺嘌呤和鸟嘌呤的聚合物或寡聚物(参见Albert L.Lehninger,Principles of Biochemistry,793-800(Worth

Pub.1982))。这些术语涵盖任何脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或肽核酸组分,以及其任何化学变体,诸如这些碱基的甲基化、羟甲基化或糖基化形式。聚合物或寡聚物在组成上可以是异质的或均质的,可以从天然存在的来源分离的,或者可以是人工或合成产生的。此外,核酸可以是DNA或RNA或其混合物,并且可以以单链或双链形式(包括同源双链体、异源双链体和杂合体状态)永久或过渡存在。在一些实施方案中,核酸或核酸序列包括其他种类的核酸结构,诸如DNA/RNA螺旋、肽核酸(PNA)、吗啉代核酸(参见例如,Braasch和Corey, Biochemistry, 41 (14):4503-4510 (2002) 和美国专利5,034,506)、锁核酸(LNA;参见 Wahlestedt等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97:5633-5638 (2000))、环己烯基核酸(参见 Wang, J. Am. Chem. Soc., 122:8595-8602 (2000))和/或核酶。术语“核酸”和“核酸序列”也可以涵盖包含非天然核苷酸、修饰的核苷酸和/或可以表现出与天然核苷酸相同的功能的非核苷酸构建模块(例如,“核苷酸类似物”)的链。

[0021] 术语“氨基酸”是指天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物,除非另外指示,否则它们都呈其D和L立体异构体,如果它们的结构允许这样的立体异构体形式。

[0022] 天然氨基酸包括丙氨酸(Ala或A)、精氨酸(Arg或R)、天冬酰胺(Asn或N)、天冬氨酸(Asp或D)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Gln或Q)、谷氨酸(Glu或E)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、亮氨酸(Leu或L)、赖氨酸(Leu或L)、甲硫氨酸(Met或M)、苯丙氨酸(Phe或F)、脯氨酸(Pro或P)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、色氨酸(Trp或W)、酪氨酸(Tyr或Y)和缬氨酸(Val或V)。

[0023] 非天然氨基酸包括但不限于吡啶羧酸、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、萘基丙氨酸(“naph”)、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、叔丁基甘氨酸(“tBuG”)、2,4-二氨基异丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、高脯氨酸(“hPro”或“homoP”)、羟赖氨酸、别羟赖氨酸、3-羟脯氨酸(“3Hyp”)、4-羟脯氨酸(“4Hyp”)、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基丙氨酸(“MeAla”或“Nime”)、N-烷基甘氨酸(N-alkylglycine, “NAG”)包括N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-烷基戊基甘氨酸(N-alkylpentylglycine, “NAPG”)包括N-甲基戊基甘氨酸、N-甲基缬氨酸、萘基丙氨酸、正缬氨酸(“Norval”)、正亮氨酸(“Norleu”)、辛基甘氨酸(“OctG”)、鸟氨酸(“Orn”)、戊基甘氨酸(“pG”或“PGly”)、哌可酸(“pipecolic acid”)、硫代脯氨酸(“ThioP”或“tPro”)、高赖氨酸(“hLys”)、高精氨酸(“hArg”)、(S)-N-Fmoc-2-(4'-戊烯基)丙氨酸、Fmoc-2,2-双(4-戊烯基)甘氨酸。可以采用的其他非天然氨基酸在例如国际专利申请公布W0 2018/106937中公开。

[0024] 术语“多肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,并且指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括编码和非编码氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸以及具有修饰的肽主链的多肽。

[0025] 如本文使用的术语“肽”包括长度为4至100个氨基酸残基、优选地长度为约10至80个残基、更优选地长度为15至65个残基的序列,并且其中一个氨基酸的 α -羧基基团通过酰胺键连接至相邻氨基酸的主链(α -或 β -)氨基基团。肽可以包含天然氨基酸、非天然氨基酸、氨基酸类似物和/或修饰的氨基酸。肽可以是天然存在的蛋白的子序列或非天然(合成)序列。

[0026] 如本文使用的,术语“免疫-两亲物”意指能够自发缔合成称为“免疫纤维”的离散的、稳定的超分子纳米结构的分子。通常,IF可以在约2.8至约7.5之间的pH范围内组装。然而,结合特性也是pH依赖性的。带正电荷的IF更容易与较高pH溶液缔合,而与之相比带负电荷的IF在较低pH溶液中将更容易缔合。

[0027] 如本文使用的,术语“抗体”是指通常包含两对相同的多肽链的免疫球蛋白分子,每对多肽链具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链。人类轻链被分类为 κ 和 λ 轻链。重链被分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链中,可变区和恒定区由约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约3个或更多个氨基酸的“D”区。每条重链包含重链可变区(在本文中被缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含3个结构域, C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包含轻链可变区(在本文中被缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域, C_L 。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。 V_H 区和 V_L 区可以被进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区和其中散布的被称为框架区(FR)的较保守的区域。每个 V_H 和 V_L 包含按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。每个重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L),分别形成抗体结合位点。术语“抗体”涵盖作为抗体多聚体(抗体的多聚体形式)(诸如单体抗体的二聚体、三聚体或更高级的多聚体)的一部分的抗体。它还涵盖与非抗体部分连接或附接,或以其他方式在物理或功能上关联的抗体。此外,术语“抗体”不受产生抗体的任何特定方法的限制。例如,除其他外,它包括重组抗体、合成抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

[0028] 如本文使用的术语“单克隆抗体”是指由B淋巴细胞的单个克隆产生的针对抗原上单个表位的抗体。单克隆抗体通常使用杂交瘤技术产生,如Köhler和Milstein, Eur. J. Immunol., 5:511-519(1976)中首次描述的。单克隆抗体也可以使用重组DNA方法生产(参见例如,美国专利4,816,567),从噬菌体展示抗体文库中分离(参见例如,Clackson等人Nature, 352:624-628(1991));和Marks等人, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)),或由携带完全人类免疫球蛋白系统的转基因小鼠生产(参见例如, Lonberg, Nat. Biotechnol., 23(9):1117-25(2005)和Lonberg, Handb. Exp. Pharmacol., 181:69-97(2008))。相比之下,“多克隆”抗体是由动物内不同B细胞谱系分泌的抗体。多克隆抗体是识别同一抗原上多个表位的免疫球蛋白分子的集合。

[0029] 术语“Fc区域”、“Fc片段”或“片段可结晶区域”在本文中可以可互换使用,以指包含铰链和恒定重链结构域(CH2和CH3)的单克隆抗体的区域。Fc区经由其与(先天)免疫细胞上的Fc受体或补系统的识别分子C1q相互作用来介导下游效应子功能。与Fc受体的相互作用可以发挥广泛的免疫调节功能,诸如响应于感染原的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。

[0030] 术语“抗体的片段”、“抗体片段”和“抗体的功能片段”在本文中可互换使用,以意指保留与抗原特异性结合能力的抗体的一个或更多个片段(通常参见, Holliger等人, Nat. Biotech., 23(9):1126-1129(2005))。抗体片段期望地包含例如一个或更多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)或其组合。抗体片段的实例包括但不限于(i) Fab片段,所述Fab片段是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,所述 $F(ab')_2$ 片

段是包含通过铰链区处的二硫键桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段；(iv)Fab'片段,所述Fab'片段使用温和还原条件由F(ab')₂片段的二硫键桥断裂产生；(v)二硫键稳定的Fv片段(dsFv)；和(vi)结构域抗体(dAb),所述结构域抗体(dAb)是特异性结合抗原的抗体单可变区结构域(V_H或V_L)多肽。

[0031] 如本文使用的,术语“抗体结合肽”意指具有以高特异性(诸如具有约10⁻⁶M至约10⁻¹⁰M的K_d)结合抗体或抗体分子的特定部分(例如Fc部分)的能力的肽。

[0032] 如本文使用的,术语“样品”意指包含可以使用本发明的免疫纤维结合的感兴趣的抗体或感兴趣的含Fc区的蛋白(例如,Fc融合蛋白)的任何样品、溶液、流体或混合物。在一些实施方案中,样品可以是生物样品。例如,样品包括例如细胞培养物、细胞裂解物和/或澄清的主体(例如,澄清的细胞培养上清液)。任选地,样品由表达感兴趣的抗体或含Fc区的蛋白(天然或重组)的宿主细胞或生物体产生。例如,细胞培养物中的细胞包括用包含编码感兴趣的抗体或Fc融合蛋白的核酸的表达构建体转染的宿主细胞。这些宿主细胞可以是培养物中生长的细菌细胞、真菌细胞、昆虫细胞或优选地动物细胞。如本文使用的术语“生物样品”和“生物流体”是指来自存活的或以前存活的患者或哺乳动物或来自培养的细胞的任何数量的物质。这样的物质包括但不限于血液、血清、血浆、尿液、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑膜组织、软骨细胞、滑膜巨噬细胞、内皮细胞、皮肤、细胞培养物、细胞裂解物和澄清的批量(例如,澄清的细胞培养物上清液)。

[0033] 术语“单体”、“单体亚基”和“单体单元”在本文中可互换使用,并指聚合物或寡聚物的基本结构单元之一。“寡聚物”是具有约1至约30个单体的分子。寡聚物的结构可以是例如线性的、支链的或叉形的。寡聚物是一种聚合物。如本文使用的术语“聚合物”是指包含由许多单体(例如,数百或数千)构成的大的分子或大分子的物质或材料。

[0034] 详述

[0035] 本公开内容至少部分基于通过共组装合理设计的填充物和配体分子来构建超分子免疫纤维(IF)系统,用于亲和沉淀和纯化单克隆抗体(mAb)。在一些实施方案中,配体分子包含与来自大多数哺乳动物物种的免疫球蛋白G(IgG)的Fc部分以pH特异性方式结合的蛋白A模拟肽。此外,一系列接头可以掺入到配体设计中,以增加蛋白A模拟肽的灵活性和可及性。鉴于单克隆抗体特别是IgG上的双Fc结合位点以及本文提供的免疫纤维的多价性,所得的增强的多价mAb-IF结合可能潜在地导致IF交联成大复合物,并促进单克隆抗体在低盐或无盐条件下沉淀。

[0036] 在这方面,本公开内容提供了一种系统,所述系统包括具有在生理条件下自组装成免疫纤维(IF)的能力的一个或更多个填充物分子和一个或更多个配体分子。如本文使用的术语“填充物”或“填充物分子”是指被添加至组合物中、可以改进组合物特定特性的分子、颗粒或化合物。在本公开内容的上下文中,一个或更多个填充物分子被设计成调节配体分子在共组装的免疫纤维中的分布。如本文使用的术语“配体”或“配体分子”是指与生物分子形成复合物以产生生物效应的物质。在一些实施方案中,配体通过与靶蛋白(例如,受体)上的位点结合来产生信号。可选地,配体可以是与核酸分子诸如DNA双螺旋结合的小分子、离子或蛋白。其他类型的配体包括但不限于类固醇激素、生长因子、神经递质和其他肽。

[0037] 在一些实施方案中,一个或更多个填充物分子中的每一个以及一个或更多个配体分子中的每一个包含缀合至氨基酸序列的线性烃链。应当理解,“烃”是完全由氢和碳组成

的有机化合物。线性烃链可以具有任何合适的长度。在一些实施方案中,线性烃链包含1至24个碳原子,例如,1至16个碳原子、1至14个碳原子、1至12个碳原子、1至10个碳原子、1至8个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。在一些实施方案中,线性烃链包含10-15个碳原子(例如,10、11、12、13、14或15个碳原子)。理想地,线性烃链包含12个碳原子。本领域普通技术人员应当理解,线性烃链中包含的碳的数量存在上限,以维持在水性溶液中的溶解度。

[0038] 一个或更多个填充物分子中的每一个以及一个或更多个配体分子中的每一个还包含缀合至线性烃链的氨基酸序列。存在于一个或更多个填充物分子中的氨基酸序列可以与存在于一个或更多个配体分子中的氨基酸序列相同或不同。理想地,填充物和配体分子中存在的氨基酸序列被设计成在共组装期间促进分子之间的相互作用。氨基酸序列可以具有任何合适的长度。在一些实施方案中,存在于填充物分子和/或配体分子中的氨基酸序列包含1-20个氨基酸,诸如1-5个氨基酸、5-10个氨基酸、1-10个氨基酸、10-15个氨基酸或15-20个氨基酸。例如,一个或更多个填充物分子中的每一个包含2-5个氨基酸(例如,2、3、4或5个氨基酸),并且在一些方面,4个氨基酸的氨基酸序列。类似地,一个或更多个配体分子中的每一个包含2-5个氨基酸(例如,2、3、4或5个氨基酸),并且在一些方面,4个氨基酸的氨基酸序列。用于包含在一个或更多个填充物分子和/或一个或更多个配体分子中的示例性氨基酸序列包括VVXX(SEQ ID NO:2,其中“X”指示任何氨基酸)。在一些实施方案中,一个或更多个填充物分子中的每一个包含氨基酸序列VVEE(SEQ ID NO:3),并且一个或更多个配体分子中的每一个包含氨基酸序列VVKK(SEQ ID NO:4)。然而,本公开内容不限于这些特定的氨基酸序列。

[0039] 除了线性烃链和氨基酸序列之外,一个或更多个配体分子中的每一个还包含接头和缀合至该接头的金黄色葡萄球菌蛋白A的Z33肽或其抗体结合片段。“接头”是能够以稳定、共价的方式将一种化合物连接至另一种化合物(例如,细胞结合剂,诸如肽配体或抗体)的任何化学部分。接头可以易于以下或大体上对以下具有抗性:酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解和/或二硫键裂解。在一些实施方案中,接头可以是侧链具有游离氨基、羧基或二硫化物基团的任何氨基酸。在本发明的一个或更多个填充物分子和/或一个或更多个配体分子中可用作氨基酸接头的示例性氨基酸包括赖氨酸(K)、谷氨酸(E)、精氨酸(R)和半胱氨酸(C)。其他合适的接头是本领域已知的,并且包括例如二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。接头还包括如本文描述和本领域已知的带电荷接头及其亲水性形式。在一些实施方案中,接头可以是可裂解接头、不可裂解接头、亲水性接头和基于二羧酸的接头。

[0040] 在一些实施方案中,接头是包含一个或更多个聚(乙二醇)(PEG)分子或一个或更多个寡(乙二醇)(OEG)分子的亲水性接头。除非另外指示,否则“PEG寡聚物”或寡乙二醇(OEG)是所有单体亚基都是环氧乙烷亚基的“PEG寡聚物”或寡乙二醇(OEG)。通常,大体上所有单体亚基或所有单体亚基是环氧乙烷亚基,尽管寡聚物可以包含不同的末端加帽部分或官能团,例如用于缀合。通常,用于本公开内容的PEG寡聚物将包括以下两种结构之一:“ $-(CH_2CH_2O)_n-$ ”或“ $-(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2-$ ”,取决于一个或更多个末端氧是否已经被置换,例如在合成转化期间。在一些实施方案中,变量(n)范围为1至30,并且整个PEG或OEG的末端基团和结构可以变化。

[0041] PEG化是聚乙二醇链通过其缀合至蛋白(例如,治疗性蛋白)、肽、适配体、酶、小分

子药物、抗体和其他分子的过程。通过PEG化过程,缀合的蛋白的分子量增加,导致体内降解减少和稳定性增加。PEG化还减少了缀合至其的蛋白的免疫原性。PEG和OEG接头以及相关的缀合方法在以下中描述:例如美国专利6,716,821;美国专利9,388,104;美国专利申请公布2009/0285780;以及Harris,J.M.和Chess,R.B.,*Nature Reviews Drug Discovery*,2:214-221(2003)。

[0042] 接头可以包含任何合适数量的PEG或OEG分子、单元或单体。在一些实施方案中,接头包含2-50(例如,5、10、15、20、25、30、35、40或45)个PEG或OEG分子。在其他实施方案中,接头包含10-20(例如,10、11、13、14、15、16、17、18、19或20)个PEG或OEG分子,或30-40(例如,31、32、33、34、35、36、37、38、39或40)个PEG或OEG分子。例如,接头可以包含16个OEG或PEG分子,或36个OEG或PEG分子。

[0043] 本文公开的配体分子还包含缀合至接头的金黄色葡萄球菌蛋白A的Z33肽或其抗体结合片段。葡萄球菌蛋白A(SPA)是最初存在于金黄色葡萄球菌的细胞壁中的蛋白。它包含折叠成三螺旋束的五个同源结构域。蛋白A在免疫学方面起着重要作用,因为它与来自大多数哺乳动物物种(包括人类)的免疫球蛋白G(IgG)的Fc部分特异性结合。已经对蛋白A进行了广泛的结构和生物化学研究。蛋白A的Z-58结构域是第一个广泛用于亲和层析和亲和沉淀的蛋白A结构域。最小化的结合结构域Z-33后来被开发出来,但没有显著改变分子的功能。Z33肽是具有氨基酸序列FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1)的蛋白A模拟物,并且包含两个 α 螺旋的基序。本公开内容还涵盖包含Z33肽的任何抗原结合片段的配体分子,或具有与SEQ ID NO:1至少95%(例如,95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列的肽。核酸和/或氨基酸同一性的程度可以使用本领域已知的任何方法,诸如BLAST序列数据库来确定。

[0044] 本公开内容还提供了一种用于纯化抗体或Fc融合蛋白的方法,所述方法包括(a)将上述系统溶解在生理pH的水性溶液中并老化过夜,由此使一个或多个填充物分子和一个或多个配体分子自组装成免疫纤维(IF);(b)将包含含有Fc区的蛋白的样品与所述IF在由此所述IF与所述Fc区结合的条件下混合以在溶液中形成免疫纤维-蛋白复合物;(c)通过添加盐和/或进行离心从所述溶液中分离所述免疫纤维-蛋白复合物;并且(d)使所述IF与所述包含Fc区的蛋白解离。任何包含Fc区的合适蛋白都可以使用本文公开的方法纯化。例如,含Fc区的蛋白可以是抗体,诸如单克隆抗体。在其他实施方案中,含Fc区的蛋白可以是Fc融合蛋白。“Fc融合蛋白”是将抗体的可结晶片段(Fc)结构域与另一种生物活性蛋白结构域或肽连接以产生具有独特结构-功能特性(并且在一些情况下,具有治疗潜力)的分子的生物工程化多肽。 γ 免疫球蛋白(IgG)同种型因为有利的特性诸如效应子功能的募集和血浆半衰期增加通常被用作产生Fc-融合蛋白的基础。在一些实施方案中,本文描述的系统可以用于通过将定制的结合对掺入到填充物和配体分子的设计中来捕获和纯化不包含Fc区的其他蛋白。

[0045] “生理学的(physiologic)”或“生理的(physiological)”pH是通常发生在人类细胞(例如,体内人类细胞)中的pH。在这方面,人体的生理学pH范围介于7.35至7.45之间,平均生理学pH处于7.40。在填充物分子和配体分子溶解在适当的pH的水性溶液中后,溶解的系统被孵育或“老化”足够的时间以使一个或多个填充物分子和一个或多个配体分子自组装成免疫纤维(IF)。填充物和配体分子在溶液中的孵育或“老化”可以持续任何合适的

时间段。在一些实施方案中,溶解的系统老化至少两小时,但不多于48小时。例如,溶解的系统可以孵育或老化2-8小时、8-12小时、12-16小时、16-20小时、20-24小时、24-36小时或36-48小时。在一些实施方案中,溶解的系统老化过夜(例如,约6、7、8、9、10、11或12小时)。

[0046] 在足够的老化时间段和IF形成之后,所公开的方法包括将包含抗体或Fc融合蛋白的样品与IF在由此IF与蛋白(例如,抗体或Fc融合蛋白)的Fc区结合的条件下混合,以在溶液中形成免疫纤维-蛋白复合物。基于亲和力的抗体纯化方法的合适条件是本领域已知的,并且可以在所公开的方法中采用。例如,适用于基于蛋白A的纯化的试剂和条件是本领域已知的,并且可以在本公开内容的上下文中使用(参见例如,Proteus Protein A Antibody Purification Handbook, Bio-Rad (2016); 以及Fishman, J.B.和Berg, E.A., Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot099143)。然后通过许多已知的分离手段,包括例如盐诱导的沉淀和离心,将形成的复合物与样品中未结合的免疫纤维和含Fc区的蛋白(例如,抗体或Fc融合蛋白)以及其他组分分离。然后将分离的复合物引入处于酸性pH的另一种溶液中,其中免疫纤维失去它们对含Fc区的蛋白(例如,抗体或Fc融合蛋白)的结合亲和力。

[0047] 然后通过过滤,诸如渗滤、微滤或其他手段,使抗体或Fc融合蛋白从免疫纤维解离。在一些实施方案中,通过将pH降低至洗脱条件(例如,pH 2.5-4.0)和过滤或微滤,使抗体或Fc融合蛋白从IF解离。在其他实施方案中,可以使用顺序沉淀使抗体或Fc融合蛋白从IF解离。在这方面,包含含Fc区的蛋白(例如,抗体或Fc融合蛋白)的样品可以与第一IF溶液(如上述制备)混合,老化或孵育任何合适的时间量(例如,2、3、4、5或6小时),并离心(例如,以10,000-20,000rpm)。然后,包含与含Fc区的蛋白复合的免疫纤维的所得上清液可以与第二IF溶液(如上述制备)混合,老化或孵育任何合适的时间量(例如,2、3、4、5或6小时),并第二次离心(例如,以10,000-20,000rpm)。上述过程可以重复任何次数,直到达到期望收率的含Fc区的蛋白(例如,抗体或Fc融合蛋白),并且然后洗涤最终沉淀物并重悬于洗脱缓冲液中。在一些实施方案中,洗脱的抗体或Fc融合蛋白可以使用膜分离方法完全回收。

[0048] 与本领域已知的其他蛋白纯化方法(特别是其中捕获步骤是由于树脂容量限制和高生产成本而导致的主要下游瓶颈之一的蛋白A层析方法)相比,本文描述的系统和方法具有几个优点。事实上,本文描述的IF系统和方法提供了单克隆抗体的高通量纯化、易于处理和成本减少。此外,公开的系统和方法允许蛋白的快速纯化,因为抗体-IF结合和凝聚可以在30分钟或更短时间内完成。

[0049] 以下实施例进一步说明本发明,但当然不应将其解释成以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0050] 在实施例中描述的实验中使用了以下材料和方法。

[0051] 材料。所有的Fmoc氨基酸和树脂从Advanced Automated Peptide Protein Technologies (AAPTEC, Louisville, KY, USA) 获得。纯的mAb1以及澄清的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养物收获物中的mAb1和mAb2从Bristol-Myers Squibb (Devens, MA, USA) 获得。使用深度过滤使细胞培养物澄清。Fmoc-N-酰氨基-0 (P) EGN-酸从PurePEG (San Diego, CA, USA) 和BroadPharm (San Diego, CA, USA) 购买。月桂酸(C12)从MilliporeSigma (St. Louis,

MO, USA) 获得。除非另外说明, 否则所有其他试剂从VWR (Radnor, PA, USA) 获得, 并按原样使用, 而无进一步纯化。

[0052] 分子合成。使用先前描述的方法合成填充物和配体分子。简言之, C12-VVEE和C12-VVKKO (P) EGnGGZ33 ($n=4, 8, 12, 16, 36, 45$) 在Liberty Blue自动微波肽合成仪 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) 上使用标准的9-芴基-甲氧羰基 (Fmoc) 固相合成方案合成。使用三氟乙酸 (TFA) /三异丙基硅烷 (TIS) / H_2O 以92.5:5:2.5的比例的混合物将粗产物从固体支持物裂解, 持续2.5小时。通过蒸发去除过量的TFA, 并且添加冰冷的乙醚以使粗产物沉淀, 随后离心。通过制备型RP-HPLC纯化粗产物, 使用Varian Polymeric柱 (PLRP-S, 100 Å, 10 μ m, 150 $\times$ 25mm) 在25 $^{\circ}$ C, 在Varian ProStar Model 325制备型RP-HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 上, 在220nm监测肽区段的吸光度。通过MALDI-TOF (BrukerAutoflex III MALDI-TOF instrument, Billerica, MA, USA) 分析收集的级分, 并且然后将含产物的级分冻干 (LABCONCOTM FreeZone-105 $^{\circ}$ C, 4.5L冷冻干燥机, Kansas City, MO, USA) 并储存在-30 $^{\circ}$ C。

[0053] CMC测量。使用尼罗红确定PBS中配体分子的CMC, 尼罗红是疏水染料, 其在分配到超分子组装体的疏水结构域中时, 经历荧光强度和发射波长两者的改变 (蓝移 (blue-shift))。最初将尼罗红以20 μ M溶解在丙酮中, 并且将10 μ l等分试样装载到几个离心管中。丙酮在室温下蒸发之后, 将500 μ L不同浓度的新鲜配体在PBS中的溶液添加到包含干尼罗红的离心管中, 并老化过夜以进行组装。然后通过具有在560nm处的固定激发波长的Fluorolog荧光计 (Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) 监测尼罗红的荧光光谱; 在580-720nm处监测发射光谱。然后将在635nm处的发射强度 (疏水环境中尼罗红的发射最大值) 与在660nm处的发射强度 (水性环境中尼罗红的发射最大值) 的比值针对测试的浓度作图, 以获得转换曲线, 并且通过两条拟合线的交点确定CMC值。

[0054] 自组装、共组装和TEM成像。为了自组装, 将填充物或配体分子溶解在PBS (20mM磷酸钠、150mM氯化钠, pH 7.4) 中, 分别达到2.5mM或400 μ M的最终浓度, 并且在室温老化24小时。为了构建共组装的IF, 将填充物和配体分子用六氟异丙醇 (HFIP) 预处理, 以消除可能在合成和纯化过程期间形成的任何预先存在的纳米结构。HFIP蒸发之后, 将填充物和配体分子溶解在PBS (20mM磷酸钠、150mM氯化钠, pH 7.4) 中以达到期望的浓度, 并且在室温老化24小时。然后将每种样品溶液的10 μ l储备液布点在具有400平方目的涂覆碳膜的铜网格 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) 上, 并用滤纸去除过量部分, 以在网格上留下薄样品膜。使样品干燥5分钟之后, 将10 μ l 2%乙酸铀酰添加至样品网格, 并且30秒之后去除过量部分。所有样品干燥至少三小时, 然后成像。明场TEM成像在FEI Tecnai 12双透射电子显微镜上进行, 并且所有TEM图像都需要SIS Megaview III广角CCD照相机。

[0055] CD光谱术。自组装的配体分子的CD光谱在Jasco J-710分光偏振仪 (JASCO, Easton, MD, USA) 上使用1mm路径长度的石英UV-vis吸收皿 (ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 在25 $^{\circ}$ C收集。获得溶剂的背景光谱, 并且从样品光谱中减去。从三次扫描中对收集的数据进行平均, 并且相对于配体浓度进行归一化。

[0056] ITC实验。使用高精度VP-ITC滴定量热系统 (Microcal Inc.) 进行ITC实验。在25 $^{\circ}$ C, 用在PBS (pH 7.4) 中的100 μ M mAb1滴定40 μ M配体溶液。从量热信号的积分中获得每次注射之后发出的热量。与配体分子和mAb1之间结合关联的热量通过减去稀释的热量获得。使

用MicroCal Origin软件包对数据进行分析。

[0057] mAb沉淀实验。在沉淀实验之前一天制备在期望的填充物和配体浓度的IF储备溶液。在实验组中,将来自浓缩溶液(448 μ M, 64.5g/L)的纯的mAb1添加到100 μ L IF溶液中,以达到期望的最终浓度,并且在室温孵育30分钟。然后将溶液以15000rpm离心15分钟。对于1M盐组,将硫酸铵添加至mAb-IF混合物中,以达到1M的最终浓度,并且再孵育30分钟,然后离心。取出上清液,并且通过ProA-HPLC (POROSTM A 20 μ M柱, 不锈钢, 2.1 $\times$ 30mm, 0.1mL) 分析,以确定蛋白浓度。每种物质(species)的沉淀量通过从添加的量中减去上清液中的量来计算。沉淀收率通过将沉淀的量除以添加的量来计算。

[0058] 使用IF溶液的连续沉淀和mAb洗脱。在沉淀实验之前一天,制备三种IF储备溶液, IF1(2.5mM填充物、250 μ M O16)、IF2(2.5mM填充物、750 μ M O16)和IF3(2.5mM填充物、200 μ M O16)。将来自浓缩溶液(448 μ M, 64.5g/L)的纯的mAb1添加到100 μ L IF1和100 μ L IF2中,以分别达到40 μ M和80 μ M的期望的最终浓度。孵育4小时之后,然后将样品以15000rpm离心15分钟,并且将上清液转移至100 μ L IF3中,再孵育4小时并随后离心。然后使用200 μ L PBS和400 μ L 洗脱缓冲液(40mM乙酸钠, pH 3.7)洗涤并且重悬来自两个沉淀步骤的沉淀物。来自每个沉淀步骤、洗涤步骤和洗脱步骤的上清液通过ProA-HPLC (POROSTM A 20 μ M柱, 不锈钢, 2.1 $\times$ 30mm, 0.1mL) 分析,以确定mAb浓度。

[0059] 从澄清的细胞培养物收获物中纯化mAb1。将处于澄清的批量状态的mAb1与在40 μ M或80 μ M浓度的优化的IF(100 μ L)一起孵育30分钟。进行相同的程序以使mAb1沉淀并获得离心的沉淀物。然后将沉淀物重悬于PBS(400 μ L, 40mM乙酸钠, pH 3.7)中,并转移至透析管(Pur-A-Lyzer Maxi, 50kDa截止分子量, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。然后将重悬的溶液在pH 3.7针对40mM乙酸钠(1L)透析24小时,透析缓冲液更换三次。蛋白、填充物和配体浓度通过ProA-HPLC和RP-UPLC确定。

[0060] 使用冻干的IF连续沉淀高mAb滴度。制备六种冻干的IF储备粉末(IF4-IF9),使得在100 μ L中溶解后,填充物和O16的浓度将分别是2.5mM和400 μ M。在沉淀实验之前一天制备冻干的IF粉末。允许IF在水中共组装24小时,然后冻干。将来自(146 μ M, 21g/L)或(215 μ M, 31g/L)浓缩的储备溶液的纯的mAb1添加至冻干的IF4中。孵育1小时之后,样品以15000rpm离心15分钟。离心之后,测量上清液体积,并且添加新鲜PBS,直到达到100 μ L的最终上清液体积。然后将第一沉淀步骤之后的100 μ L上清液添加到下一个冻干的IF储备粉末(IF5)中,并且允许再孵育一小时。重复孵育、离心和上清液转移的过程,直到所有六个冻干的IF(IF4-IF9)都用于mAb沉淀。第一、第三和第六沉淀步骤之后的上清液使用ProA-HPLC分析,以测量整个沉淀过程中剩余的mAb的累积量。

[0061] 实施例1

[0062] 本实施例描述了本文公开的系统的分子设计和表征。

[0063] 免疫纤维系统通过填充物和配体分子的共组装形成。填充物分子C12-VVEE被设计成调节配体分子在共组装的IF中的分布(图1A)。具有双螺旋基序的Z33肽缀合在配体分子C12-VVKK[接头]Z33的C末端上,用于特异性单克隆抗体捕获(图1A)。在先前的配体设计(G2)中,双甘氨酸(GG)区段作为接头插入在IF表面和Z33之间。为了进一步增加Z33的柔性和可及性,设计了一系列配体分子O4、O8、O12、O16、O36和P2000,具有不同OEG(或PEG)接头(n=4、8、12、16、36、45),如表1中总结的。

[0064] 表1.具有不同接头的配体分子设计的总结。

[0065]	配体分子 C12-VVKK[接头]Z33	接头	计算的完全延伸的接头长度(nm)	分子量 (kDa)	CMC (μ M)
	G2	GG	0.7	4.9	2.0
	O4	OEG4	1.9	5.0	5.1
	O8	OEG8	3.5	5.2	6.0
	O12	OEG12	5.1	5.3	8.5
	O16	OEG16	6.7	5.5	10.5
	O36	OEG36	14.6	6.4	9.1
	P2000	PEG2000	18.2	6.8	8.1

[0066] 如图1B中示出的,随着OEG(或PEG)长度的增加,预期Z33肽延伸进一步远离IF表面。假设OEG(或PEG)接头的引入将进一步减少IF径向的方向上的空间位阻,并且改进两个Fc结合位点的mAb-IF相互作用。填充物和配体分子使用自动化固相肽合成(SPPS)方法合成。

[0067] 图1C图示了填充物和配体分子在水性溶液中的自发共组装过程,形成具有展示在IF表面上的Z33的丝状IF。添加mAb后,mAb在IF溶液中存在四种可能的状态。状态1和2分别表示与来自两个不同IF或同一IF的两个配体结合的mAb的两个Fc部分。在状态3中,mAb的仅一个Fc部分与IF上的一个配体结合。考虑到配体单体和共组装的结构之间的平衡,也可能的是,在状态4中,mAb与溶液中的零个、一个或两个单体配体结合,而不是与IF中组装的单体配体结合。mAb结合和沉淀表示两个独立的过程。先前的结果显示,1M盐不能直接使mAb1沉淀,但它用作强电荷筛选剂使几乎所有的IF沉淀,并且因此使与IF结合的mAb(状态1-3)沉淀。然而,在无盐条件下,与IF的结合可能不足以使mAb被沉淀。mAb在无盐条件下沉淀的关键可能在于交联的mAb-IF复合物的形成,这主要由状态1中的mAb触发。

[0068] 实施例2

[0069] 本实施例描述了使用本文公开的系统和方法生产的免疫纤维的分子组装和表征。

[0070] 为了评价共组装的IF中填充物和配体分子的行为,首先在磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4中研究它们的自组装特性。如图2A中示出的,填充物分子能够自组装成具有 7.4 ± 0.6 nm的直径的丝状结构。使用OEG(或PEG)接头,配体分子的临界胶束浓度(CMC)相对高于先前的G2配体,范围为5.1至10.5 μ M(表1)。代表性透射电子显微术(TEM)图像揭示,配体分子中的每一个可以自组装成分别具有以下直径的丝状结构: 11.1 ± 0.9 nm(O4)、 12.6 ± 1.2 nm(O8)、 13.6 ± 1.2 nm(O12)、 14.9 ± 1.3 nm(O16)、 18.5 ± 1.8 nm(O36)和 19.3 ± 2.0 nm(P2000)(图2B-图2G)。如预期的,IF直径随着接头长度的增加而增加。为了深入了解自组装的配体分子内的分子堆积,收集新设计的配体分子中的每一个的圆二色性(CD)光谱。208nm和222nm附近的负峰表明所有自组装的配体分子中 α -螺旋二级结构的保留(图2H),如原始Z33肽中示出的。使用等温滴定量热法(ITC)确定单克隆人类IgG1(144kDa,缩写为“mAb1”)和配体分子O4-O16之间的结合亲和力。解离常数Kd范围在50nM和70nM之间,类似于报道的游离Z33肽的值(26nM),显示配体分子内OEG接头的缀合不会显著损害其mAb结合亲和力(图3A-图3D)。

[0071] 实施例3

[0072] 本实施例显示接头长度和配体选择对抗体收率的影响。

[0073] 为了比较配体性能,使用先前描述类似方法,将100 μ M配体分子与2.5mM填充物分子在100 μ L PBS (pH 7.4) 中单独共组装。发现在2.5mM(溶解度极限)的填充物分子给出最好的mAb沉淀结果,并且在本文描述的实验中一直使用。然后将来自储备溶液的纯的mAb1添加到不同的IF溶液中,以达到20 μ M的最终浓度,并且在室温孵育30分钟。为了研究盐对mAb沉淀收率的影响,对每个共组装的IF系统进行两个平行实验:一个含1M盐,且一个不含盐(图4A)。离心之后,通过ProA-HPLC分析上清液,以确定剩余mAb浓度并且计算mAb沉淀收率。当配体设计中用O(P)EG接头替代GG接头时,用1M盐,mAb沉淀收率显示从65%显著改进至高于88%。特别地,对于04-036获得大于95%的mAb沉淀收率。由于在1M盐条件下针对IF沉淀效率不存在偏倚,这种从G2至具有OEG(或PEG)接头的新配体分子的mAb沉淀收率增加特别反映了由于接头长度和柔性增加而导致的mAb结合效率的显著改进。对于P2000观察到mAb沉淀收率轻微下降,可能是由于长PEG链的纠缠破坏了Z33肽对于mAb捕获的可及性。

[0074] 在无盐条件下,mAb沉淀收率通常低于盐组,而随着OEG接头长度的增加,观察到上升趋势。与盐组不同,mAb在无盐条件下的沉淀收率由mAb结合效率和mAb-IF复合物的沉淀效率的组合决定。从04至036,mAb结合效率不存在明显差异,如盐组数据集指示的。mAb在无盐条件下的沉淀收率的增加表示mAb沉淀效率的增强,这可能由IF之间改进的交联引起。更重要的是,1M盐和无盐组之间的收率差异随着接头长度的增加而逐渐减小,导致036的收率差异小于10%。这被认为非常有希望的mAb沉淀,因为通过使用OEG或(PEG)接头实现的改进的mAb-IF相互作用可能会替代盐对mAb沉淀的贡献。

[0075] 为了确认以上观察结果并初步了解该IF系统的mAb结合能力,以较高的mAb1浓度(40 μ M)重复实验。如图4B中示出的,观察到类似的收率趋势,除了04-036的1M盐组轻微上升趋势之外,指示随着OEG接头长度的增加,mAb结合效率改进。尽管mAb沉淀收率从20 μ M mAb持续下降至40 μ M mAb,但100 μ L样品的沉淀的mAb质量(20 μ M:0.3mg;40 μ M:0.6mg)实际上与40 μ M mAb相似或更高(图4C-图4D),显示IF表面展示的Z33肽没有被20 μ M mAb1完全饱和,并且如果添加更多mAb,可能会被进一步利用。

[0076] mAb沉淀收率的差异也可以通过IF溶液的浑浊度(cloudiness)来揭示。mAb添加之后,012、016、036和P2000的IF溶液在5分钟内变得浑浊,这在前三个IF系统中是观察不到的。图4E示出了在1M盐或无盐条件下与40 μ M mAb1混合5分钟之后的04-016 IF的样品小瓶。通常,盐组的混浊度相对高于无盐组,表明盐组的mAb沉淀收率更高。同时,混浊度从04至016增加,与图4B中示出的收率趋势一致。

[0077] 这些结果显示,接头长度的增加可以同时改进配体分子的mAb结合效率以及mAb-IF复合物的沉淀效率。尽管036在所有条件下显示出最好的mAb沉淀收率,但016在合成收率和材料成本方面更理想,并且被选择用于随后的实验。

[0078] 实施例4

[0079] 本实施例描述了使用本文公开的方法对单克隆抗体在无盐条件下沉淀的优化。

[0080] 在先前的研究中,配体:mAb摩尔比显示在mAb沉淀收率方面起着最重要的作用。为了优化mAb在无盐条件下的沉淀收率以及研究016 IF系统是否能有效地应用于高mAb浓度,将mAb1以40 μ M(6mg/ml)、80 μ M(12mg/ml)、133 μ M(20mg/ml)三种浓度与2.5mM填充物分子和在不同浓度的016配体分子形成的IF在100 μ L PBS中一起孵育。图5A和图5B分别示出了mAb沉淀收率和质量与016浓度的关系图,并且对于所有三种mAb浓度,在配体:mAb摩尔比在6:1

至9:1之间时观察到最佳点。在最佳016浓度,40和80 μ M mAb的mAb沉淀收率是约85%,而133 μ M mAb的mAb沉淀收率仅是约65%,显示当按比例扩大高mAb浓度时,IF性能下降。为了更好地理解为什么在最佳016浓度没有达到100% mAb沉淀收率,在1M盐和无盐两种条件下,对40 μ M mAb与最佳IF(2.5mM填充物、250 μ M 016)进行平行实验(图5C)。当存在1M盐时,多于99%的mAb1被沉淀,指示mAb1被完全捕获到IF上。然而,对于无盐组,仅88%的mAb1沉淀,这归因于可能由有限的IF交联引起的IF沉淀不足。

[0081] 为了理解图5A和图5B中观察到的mAb沉淀收率的趋势,状态3、状态1和状态2可能分别在低、中和高配体浓度占优势(图5D)。在低配体浓度,所有配体都被过量的mAb饱和,几乎没有留给第二Fc位点的结合(状态3)。最初的收率增加可以归因于随着配体浓度增加的IF交联(状态1)双位点mAb结合的增加。最佳操作点之后,进一步增加配体浓度导致收率下降,这可能由交联效率的下降引起,因为随着IF表面上016配体间距的下降,mAb与来自同一IF(状态2)的两个Z33结合的机会会高得多。

[0082] 为了深入了解凝聚的动力学,通过在350nm处的吸光度监测40 μ M mAb1和优化的IF(2.5mM填充物、250 μ M 016)的混合物的浊度,持续24小时。如图5E中示出的,浊度随着时间增加,并且在30分钟内稳定下来,表明快速的初始凝聚。为了将溶液浊度与mAb沉淀收率相关联,对上清液进行30分钟、2小时和24小时分析(图5F)。与浊度研究一致,mAb-IF结合和凝聚几乎可以在30分钟内完成,以达到83%的高沉淀收率。虽然在2小时(88%)和24小时(92%)内观察到轻微的收率增加,这在较低灵敏度浊度研究中没有揭示,但它牺牲了mAb沉淀过程的时间效率。

[0083] 实施例5

[0084] 本实施例描述了单克隆抗体的顺序沉淀和洗脱。

[0085] 为了进一步改进mAb沉淀收率,进行两步顺序沉淀来使剩余的mAb沉淀。如图6A中描绘的,将来自第一沉淀步骤的上清液添加到新鲜IF溶液中。然后使用PBS进行洗涤步骤,以从两个沉淀步骤中去除沉淀物中非特异性结合的杂质。为了重悬沉淀的mAb,添加洗脱缓冲液(40mM乙酸钠,pH 3.7)以使mAb-IF复合物解离。

[0086] 作为概念验证,用纯的mAb1以40 μ M和80 μ M进行顺序沉淀。对于第一次沉淀,40 μ M (6mg/mL)和80 μ M (12mg/mL) mAb1分别与包含250 μ M和750 μ M 016的IF一起孵育,优化条件如图5A所示。两组均沉淀多于82%的mAb1,而上清液中仍有8~20 μ M的mAb1(图6B)。基于图7所示的另一组016浓度优化,包含200 μ M 016的IF用于第二沉淀步骤。最终,对于两种mAb浓度,实现了大于97%的最终沉淀收率和~88%的洗脱收率,在洗涤步骤期间收率损失很小(图6B)。为了完全回收洗脱的mAb,将使用50kDa的截止膜进行膜分离步骤,以分离mAb1(~144kDa)和解离的IF(单体大小<6kDa)(图6A)。然后将这种使用溶解的IF的顺序沉淀应用于将mAb1从在40 μ M和80 μ M mAb1的澄清的细胞培养物收获物中分离,其中对于相应的mAb滴度,实现多于86%和90%的mAb1沉淀收率(图6C)。

[0087] 为了以超过20mg/mL的mAb滴度实现高mAb沉淀收率,使用包含2.5mM填充物和400 μ M 016与100 μ L 21mg/mL或31mg/mL纯的mAb混合的新鲜冻干的IF进行顺序沉淀。将mAb与冻干的IF一起孵育1小时,然后离心。离心步骤之后,测量仍包含mAb的上清液,并且添加新鲜PBS,直到达到100 μ L的最终体积。用以相同浓度的新鲜制备的冻干的IF重复沉淀步骤,直到已经完成总计六个沉淀步骤(图6D)。第一、第三和第六沉淀步骤之后的上清液使用ProA-

HPLC分析,以测量整个沉淀过程中剩余的mAb的累积量。如图6E和图6F中示出的,在六个孵育和离心步骤之后,几乎所有的mAb都被沉淀,对于21mg/mL和31mg/mL mAb滴度,收率分别达到96%和98%。此外,仅在三个沉淀步骤之后,mAb沉淀收率从约20%急剧增加至80%,指示在该过程的早期达到最佳配体:蛋白比,因为随着每个连续的沉淀步骤捕获和分离更多的蛋白。

[0088] 以上实施例说明了一系列包含OEG(或PEG)接头的超分子IF系统的设计和构建,并且显示IF径向的方向上表位形貌(topography)对IF生物活性的影响。描述的结果揭示,增加OEG16的接头长度可以同时改进在无盐条件下的单克隆结合和沉淀效率。然而,太长的接头显示对所得超分子聚合物的功能的不利影响。重要的是,通过调节配体浓度以达到期望的单克隆抗体结合状态,可以有效地优化在无盐条件下的mAb沉淀收率。工程化接头以更好表位呈递的策略为设计用于特异性分子识别和靶向药物递送的超分子聚合物提供了重要的启示。本文描述的超分子IF系统可以用作纯化单克隆抗体的有效替代方案,并且可以应用于通过将定制的结合对掺入到系统设计中捕获和纯化其他感兴趣的分子。

[0089] 参考文献

[0090] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均由此通过引用并入,其程度如同每一篇参考文献被单独且具体地指示通过引用并入本文并且其整体在本文被列出一样。

[0091] 1. Adelizzi, B.; Van Zee, N. J.; de Windt, L. N. J.; Palmans, A. R. A.; Meijer, E. W. Future of Supramolecular Copolymers Unveiled by Reflecting on Covalent Copolymerization. *Journal of the American Chemical Society* 2019, 141, 6110-6121.

[0092] 2. Aida, T.; Meijer, E. W. Supramolecular Polymers-We've Come Full Circle. *Israel Journal of Chemistry* 2020, 60, 33-47.

[0093] 3. Stupp, S. I.; Clemons, T. D.; Carrow, J. K.; Sai, H.; Palmer, L. C. Supramolecular and Hybrid Bonding Polymers. *Israel Journal of Chemistry* 2020, 60, 124-131.

[0094] 4. Webber, M. J.; Appel, E. A.; Meijer, E. W.; Langer, R. Supramolecular Biomaterials. *Nature Materials* 2016, 15, 13-26.

[0095] 5. Shy, A. N.; Kim, B. J.; Xu, B. Enzymatic Noncovalent Synthesis of Supramolecular Soft Matter for Biomedical Applications. *Matter* 2019, 1, 1127-1147.

[0096] 6. Aida, T.; Meijer, E. W.; Stupp, S. I. Functional Supramolecular Polymers. *Science* 2012, 335, 813-817.

[0097] 7. Sato, K.; Hendricks, M. P.; Palmer, L. C.; Stupp, S. I. Peptide Supramolecular Materials for Therapeutics. *Chemical Society Reviews* 2018, 47, 7539-7551.

[0098] 8. Cui, H. G.; Webber, M. J.; Stupp, S. I. Self-Assembly of Peptide Amphiphiles: From Molecules to Nanostructures to Biomaterials. *Biopolymers* 2010, 94, 1-18.

[0099] 9. Acar, H.; Srivastava, S.; Chung, E. J.; Schnorenberg, M. R.; Barrett, J. C.; LaBelle, J. L.; Tirrell, M. Self-Assembling Peptide-Based Building Blocks in

Medical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2017, 110, 65-79.

[0100] 10. Su, H.; Wang, F.H.; Ran, W.; Zhang, W.J.; Dai, W.B.; Wang, H.; Anderson, C.F.; Wang, Z.Y.; Zheng, C.; Zhang, P.C.; Li, Y.P.; Cui, H.G. The Role of Critical Micellization Concentration in Efficacy and Toxicity of Supramolecular Polymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2020, 117, 4518-4526.

[0101] 11. Wang, H.M.; Feng, Z.Q.Q.; Xu, B. Supramolecular Assemblies of Peptides or Nucleopeptides for Gene Delivery. *Theranostics* 2019, 9, 3213-3222.

[0102] 12. Moore, A.N.; Hartgerink, J.D. Self-Assembling Multidomain Peptide Nanofibers for Delivery of Bioactive Molecules and Tissue Regeneration. *Accounts of Chemical Research* 2017, 50, 714-722.

[0103] 13. VandenBerg, M.A.; Sahoo, J.K.; Zou, L.; McCarthy, W.; Webber, M.J. Divergent Self-Assembly Pathways to Hierarchically Organized Networks of Isopeptide-Modified Discotics under Kinetic Control. *ACS Nano* 2020.

[0104] 14. Wang, F.H.; Xu, D.Q.; Su, H.; Zhang, W.J.; Sun, X.R.; Monroe, M.K.; Chakraborty, R.W.; Wang, Z.Y.; Dai, W.B.; Oh, R.; Wang, H.; Fan, Q.; Wan, F.Y.; Cui, H.G. Supramolecular Prodrug Hydrogelator as an Immune Booster for Checkpoint Blocker-Based Immunotherapy. *Science Advances* 2020, 6.

[0105] 15. Chen, C.H.; Palmer, L.C.; Stupp, S.I. Self-Repair of Structure and Bioactivity in a Supramolecular Nanostructure. *Nano Letters* 2018, 18, 6832-6841.

[0106] 16. Storrie, H.; Guler, M.O.; Abu-Amara, S.N.; Volberg, T.; Rao, M.; Geiger, B.; Stupp, S.I. Supramolecular Crafting of Cell Adhesion. *Biomaterials* 2007, 28, 4608-4618.

[0107] 17. Du, X.W.; Zhou, J.; Xu, B. Supramolecular Hydrogels Made of Basic Biological Building Blocks. *Chemistry-an Asian Journal* 2014, 9, 1446-1472.

[0108] 18. Sur, S.; Tantanakitti, F.; Matson, J.B.; Stupp, S.I. Epitope Topography Controls Bioactivity in Supramolecular Nanofibers. *Biomaterials Science* 2015, 3, 520-532.

[0109] 19. Pashuck, E.T.; Duchet, B.J.R.; Hansel, C.S.; Maynard, S.A.; Chow, L.W.; Stevens, M.M. Controlled Sub-Nanometer Epitope Spacing in a Three-Dimensional Self-Assembled Peptide Hydrogel. *ACS Nano* 2016, 10, 11096-11104.

[0110] 20. Guler, M.O.; Hsu, L.; Soukasene, S.; Harrington, D.A.; Hulvat, J.F.; Stupp, S.I. Presentation of Rgd Epitopes on Self-Assembled Nanofibers of Branched Peptide Amphiphiles. *Biomacromolecules* 2006, 7, 1855-1863.

[0111] 21. Hudalla, G.A.; Sun, T.; Gasiorowski, J.Z.; Han, H.F.; Tian, Y.F.; Chong, A.S.; Collier, J.H. Graded Assembly of Multiple Proteins into Supramolecular Nanomaterials. *Nat. Mater.* 2014, 13, 829-836.

[0112] 22. Cheetham, A.G.; Zhang, P.C.; Lin, Y.A.; Lock, L.L.; Cui, H.G. Supramolecular Nanostructures Formed by Anticancer Drug Assembly. *Journal of the American*

Chemical Society 2013,135,2907-2910.

[0113] 23.Trent,A.;Marullo,R.;Lin,B.;Black,M.;Tirrell,M.Structural Properties of Soluble Peptide Amphiphile Micelles.Soft Matter 2011,7,,9572-9582.

[0114] 24.Bolton,G.R.;Mehta,K.K.The Role of More Than 40 Years of Improvement in Protein a Chromatography in the Growth of the Therapeutic Antibody Industry.Biotechnol.Prog.2016,32,1193-1202.

[0115] 25.Gronemeyer,P.;Ditz,R.;Strube,J.Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing.Bioengineering 2014,1,188-212.

[0116] 26.Mullerpatan,A.;Chandra,D.;Kane,E.;Karande,P.;Cramer,S.Purification of Proteins Using Peptide-Elp Based Affinity Precipitation.Journal of Biotechnology 2020,309,59-67.

[0117] 27.Venkiteshwaran,A.;Heider,P.;Teyssere,L.;Belfort,G.Selective Precipitation-Assisted Recovery of Immunoglobulins from Bovine Serum Using Controlled-Fouling Crossflow Membrane Microfiltration.Biotechnology and Bioengineering 2008,101,957-966.

[0118] 28.Fausnaugh,J.L.;Pfannkoch,E.;Gupta,S.;Regnier,F.E.High-Performance Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins.Anal Biochem 1984,137,464-72.

[0119] 29.Baldwin,R.L.How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability.Biophysical Journal 1996,71,2056-2063.

[0120] 30.Majumdar,R.;Manikwar,P.;Hickey,J.M.;Samra,H.S.;Sathish,H.A.;Bishop,S.M.;Middaugh,C.R.;Volkin,D.B.;Weis,D.D.Effects of Salts from the Hofmeister Series on the Conformational Stability,Aggregation Propensity,and Local Flexibility of an Iggl Monoclonal Antibody.Biochemistry2013,52,3376-3389.

[0121] 31.Swartz,A.R.;Xu,X.K.;Traylor,S.J.;Li,Z.J.;Chen,W.One-Step Affinity Capture and Precipitation for Improved Purification of an Industrial Monoclonal Antibody Using Z-Elp Functionalized Nanocages.Biotechnology and Bioengineering 2018,115,423-432.

[0122] 32.Li,Y.;Lock,L.L.;Wang,Y.Z.;Ou,S.H.;Stern,D.;Schon,A.;Freire,E.;Xu,X.K.;Ghose,S.;Li,Z.J.;Cui,H.G.Bioinspired Supramolecular Engineering of Self-Assembling Immunofibers for High Affinity Binding of Immunoglobulin G.Biomaterials 2018,178,448-457.

[0123] 33.Braisted,A.C.;Wells,J.A.Minimizing a Binding Domain from Protein A.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1996,93,5688-5692

[0124] 除非另外指示或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(特别是在所附权利要求的上下文中)使用术语“一(a)”和“一个(an)”和“该(the)”和“至少一个(at least one)”和相似的指代应被解释为覆盖单数和复数两者。除非本文另外指示或明确地

与上下文相矛盾,否则使用术语“至少一个”后跟一个或更多个项目(例如,“A和B中的至少一个”)应被解释为表示从列出的项目选择一个项目(A或B)或列出的项目中的两个或更多个项目的任何组合(A和B)。除非另外注明,否则术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”以及“包含(containing)”被解释为开放式术语(即,意指“包括但不限于”)。除非本文另外指示,否则本文值的范围的引述仅仅旨在用作单独提及落入该范围内的各个单独的值的简写方法,并且各个单独的值被并入本说明书中,如同其在本文被单独引述一样。本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行,除非本文另外指示或以其他方式与上下文明显矛盾。除非另外声明,否则本文所提供的任何以及所有实例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅仅意图更好地说明本发明且不对本发明的范围施加限制。本说明书中的语言不应被解释为指示任何未要求保护的要素对本发明的实践必不可少。

[0125] 本文描述了本发明的优选的实施方案,包括本发明人已知用于进行本发明的最佳模式。在阅读先前描述后,那些优选的实施方案的变化形式对于本领域普通技术人员可以变得明显。本发明人预期技术人员视需要利用这样的变化形式,并且本发明人意图本发明以不同于本文具体描述的方式被实施。因此,本发明包括被适用法律许可的在此所附权利要求书中阐述的主题的所有修改形式和等同物。此外,除非本文另外指示或另外与上下文明显矛盾,否则上文描述的要素以其所有的可能的变化形式的任何组合被包含在本发明内。

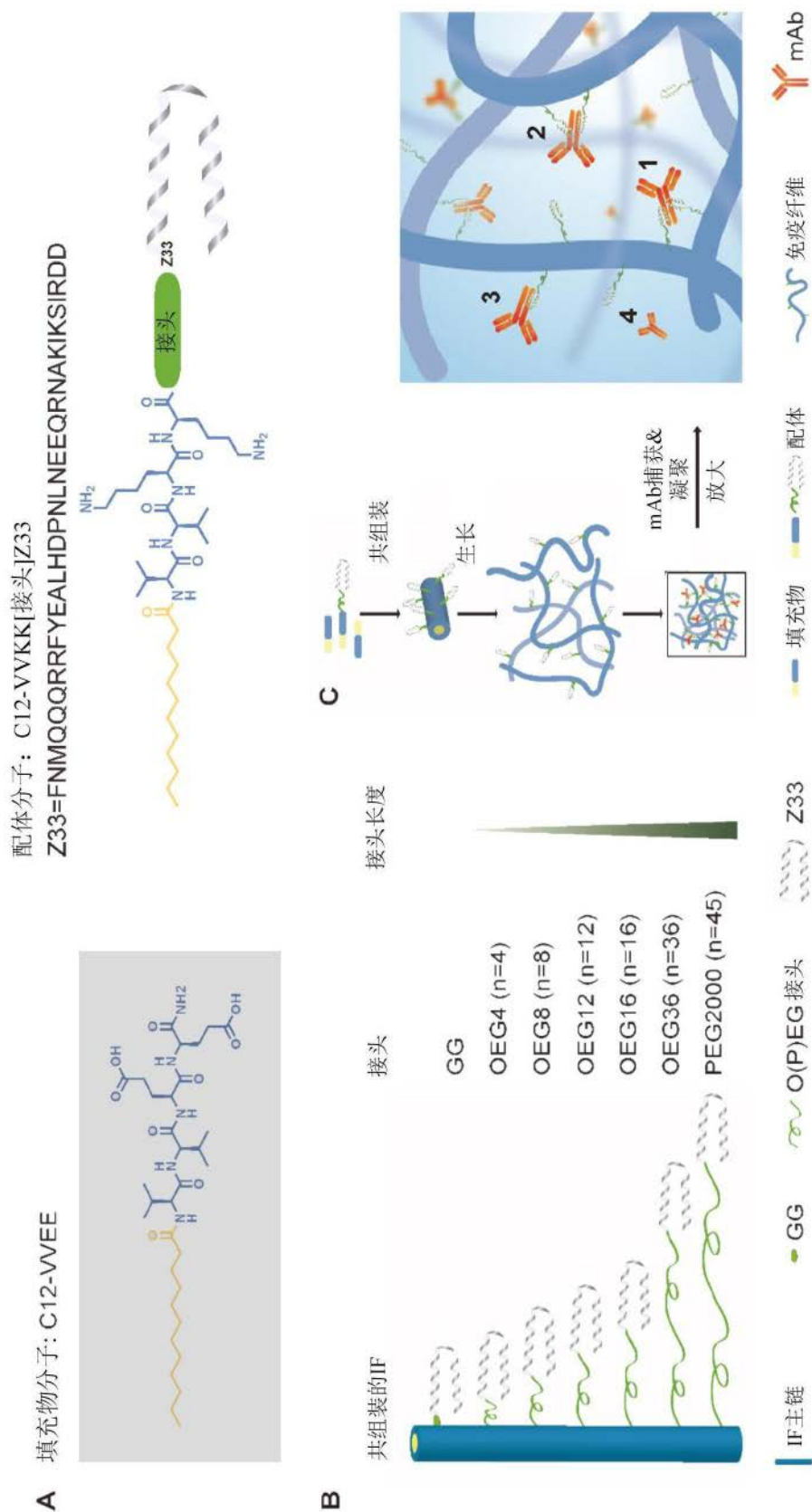


图1A-1C

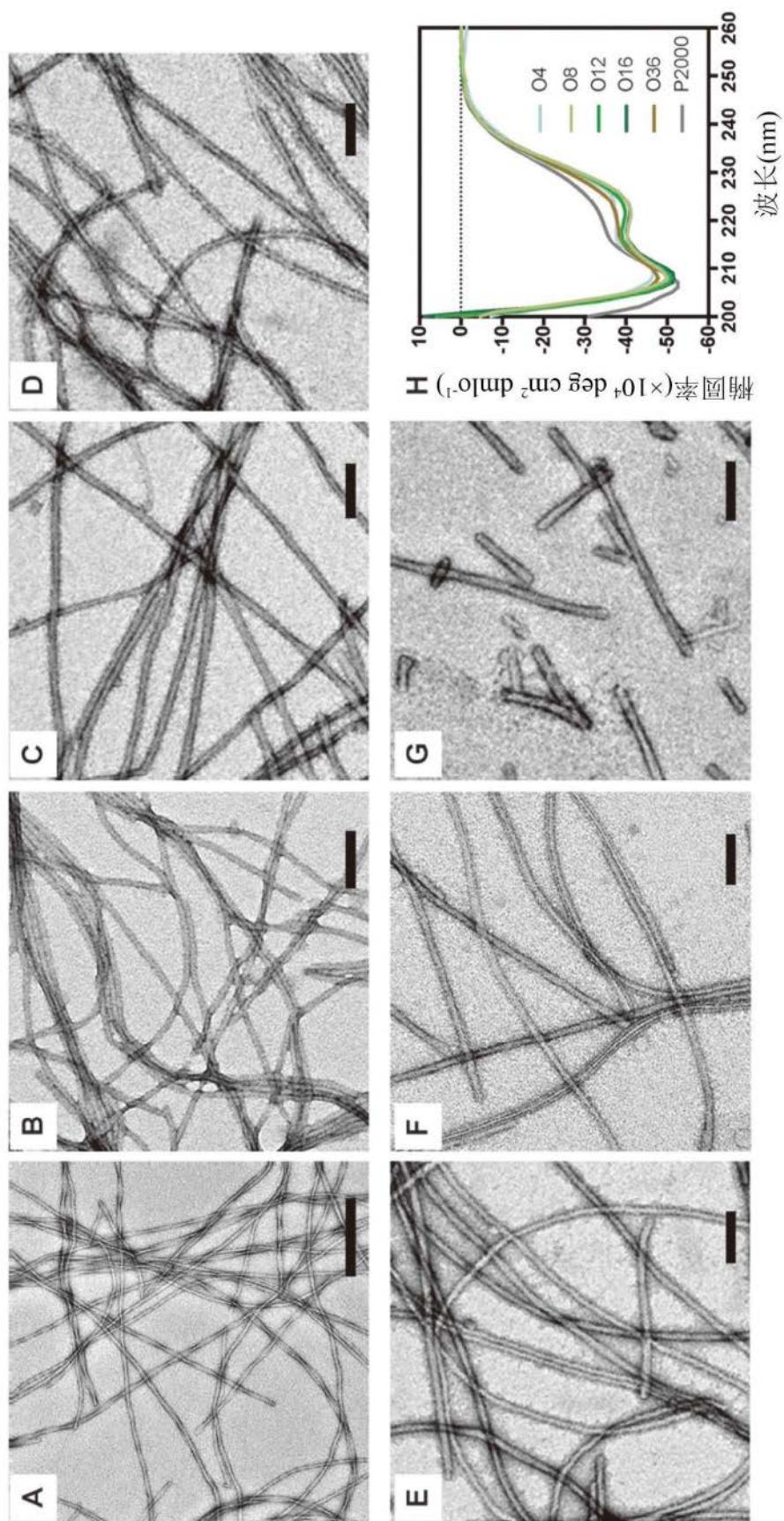


图2A-2H

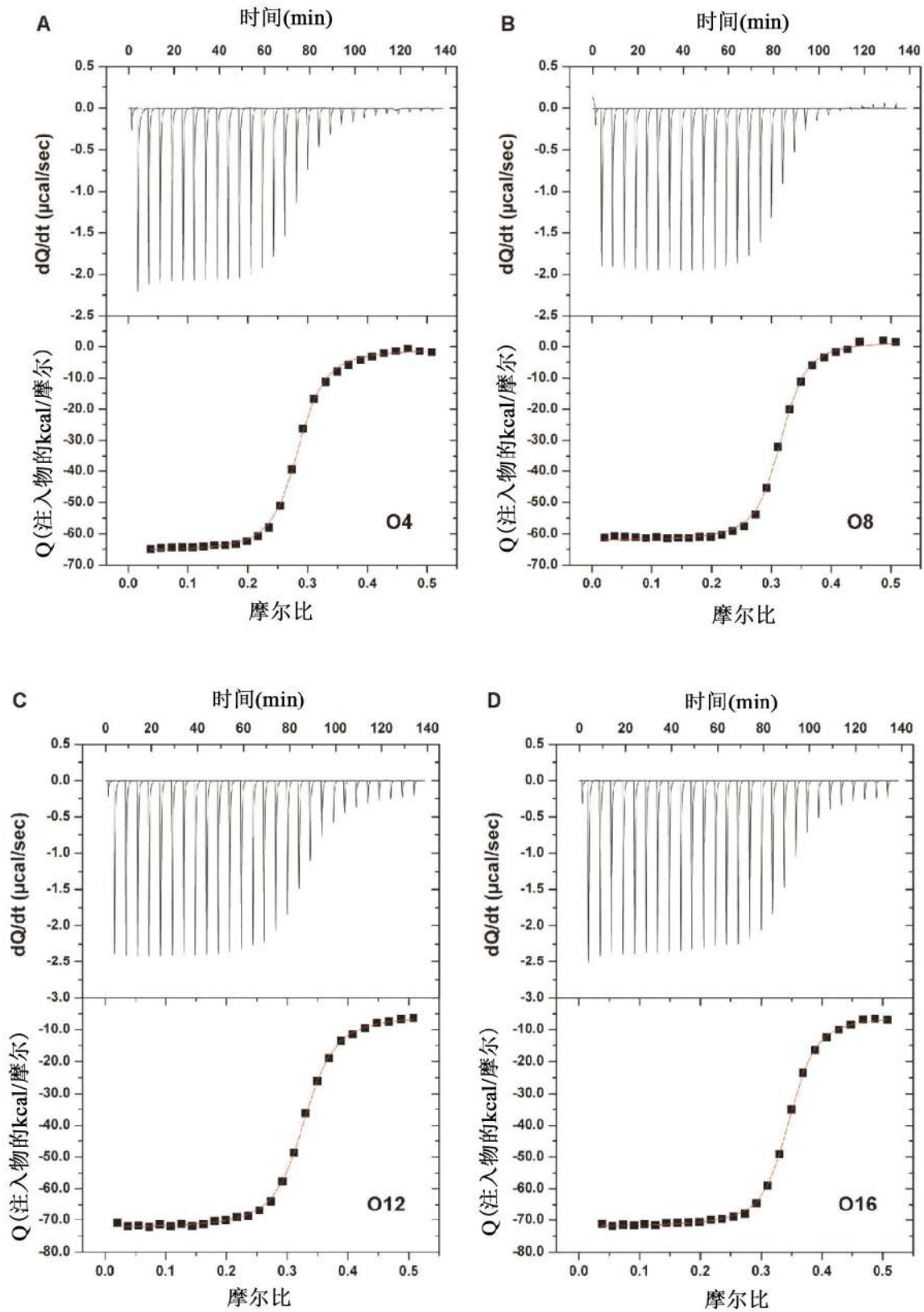


图3A-3D

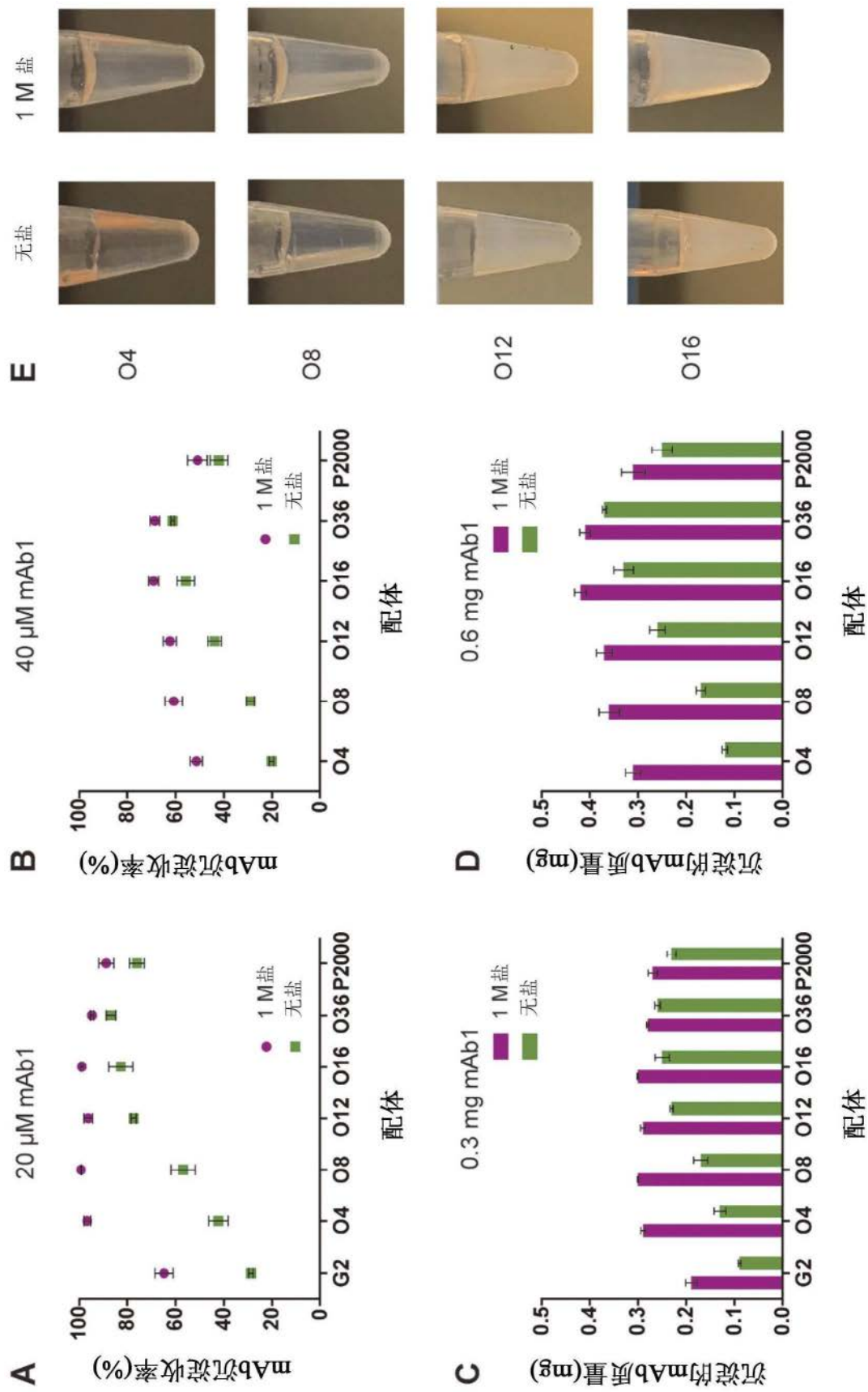


图4A-4E

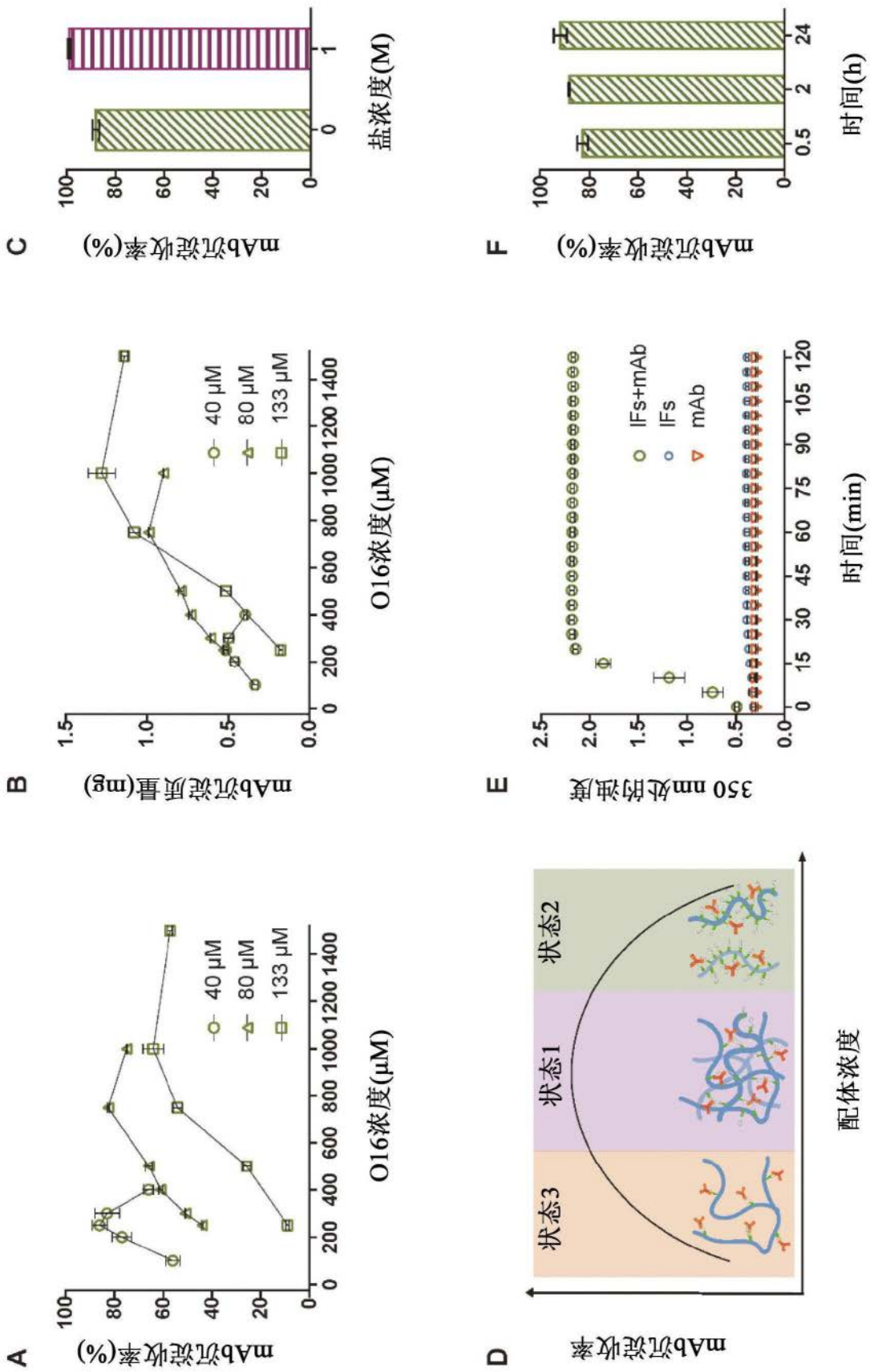


图5A-5F

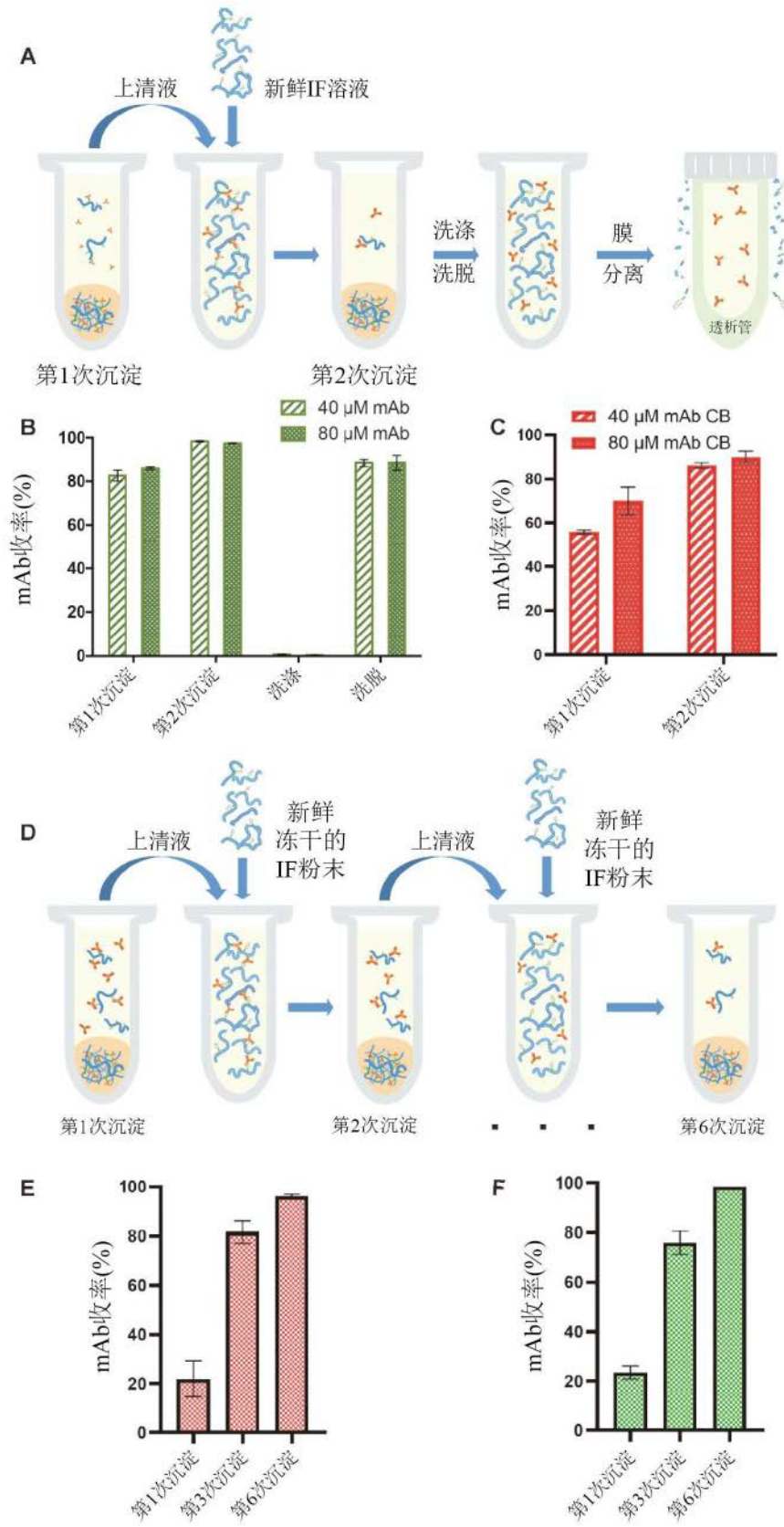


图6A-6F

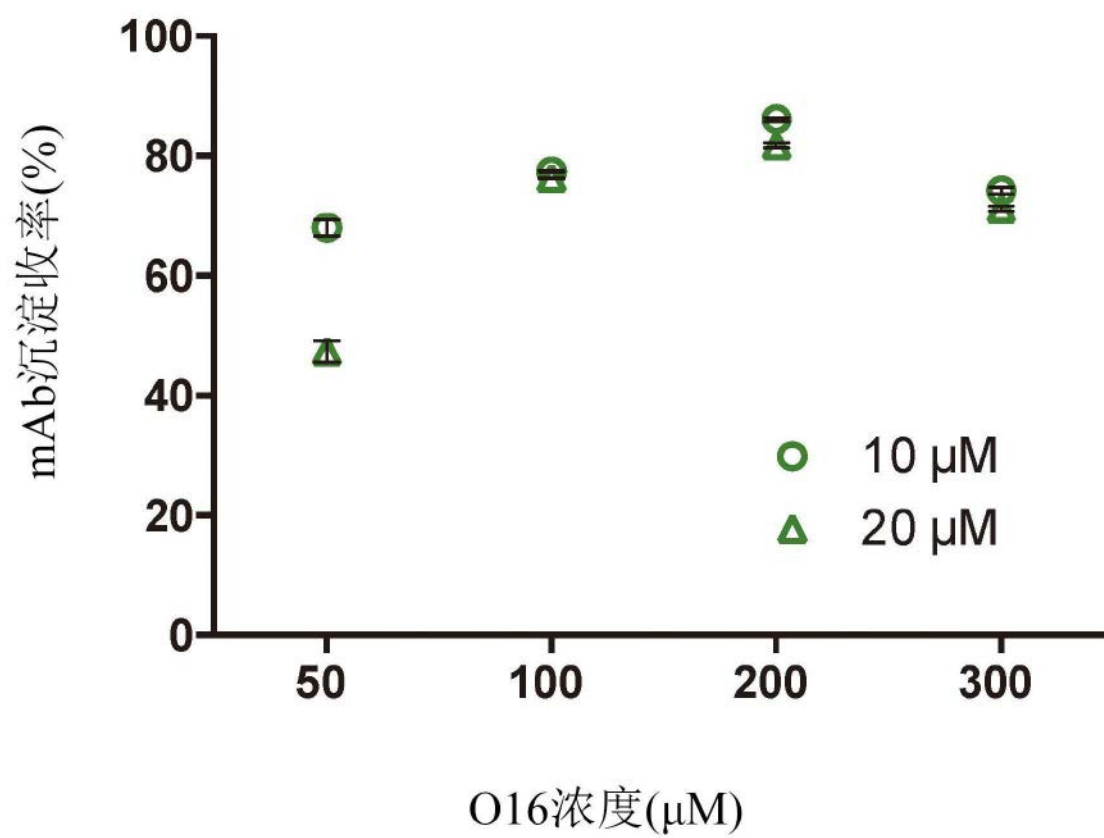


图7