



(10) 授权公告号 CN 110741017 B

(45) 授权公告日 2023.08.29

(21) 申请号 201880036846.7

(22) 申请日 2018.03.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110741017 A

(43) 申请公布日 2020.01.31

(30) 优先权数据
62/478,886 2017.03.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/024721 2018.03.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/183417 EN 2018.10.04

(73) 专利权人 约翰霍普金斯大学
地址 美国马里兰州
专利权人 百时美施贵宝公司

(72) 发明人 崔宏刚 李奕 徐晖阔 陆丽琳
李正剑

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(56) 对比文件
US 6197927 B1, 2001.03.06
Manli Deng 等. Self-assembly of
peptide-amphiphile C12-Abeta(11-17) into
nanofibrils. 《J Phys Chem B》. 2009, 8539-44.

审查员 彭郁葱

权利要求书1页 说明书20页
序列表1页 附图10页

(54) 发明名称

用于纯化生物大分子的超分子高亲和力蛋白结合系统

(57) 摘要

在某些实施方案中, 本发明提供了使用可能简单且成本有效的手段的新型抗体纯化方法和系统。在一些实施方案中, 源自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白A的定制的Z-33被用于构建免疫两亲物分子, 该免疫两亲物分子可以在水性溶液中组装成在表面上具有生物活性表位并且具有IgG结合能力的免疫纤维。

1. 一种免疫两亲物,包含金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A的Z33肽的亲水性氨基酸序列,所述亲水性氨基酸序列在其N末端与一个长度为12个碳的直链烃链缀合或与两个长度为8个碳的直链烃链缀合,其中所述Z33肽的亲水性氨基酸序列由FNMQQQRRFYEALHDPNLNNEEQRNAKIKSIRDD (SEQ ID NO:1) 组成,所述Z33肽当在生理pH的水性溶液中时采用 α -螺旋构象。

2. 权利要求1所述的免疫两亲物,所述免疫两亲物由在N末端与一个月桂酸部分或两个辛酸部分缀合的所述Z33肽的亲水性氨基酸序列组成。

3. 权利要求1或2所述的免疫两亲物,其中所述免疫两亲物被缀合至荧光染料。

4. 权利要求3所述的免疫两亲物,其中所述荧光染料是罗丹明B。

5. 一种用于纯化抗体或Fc融合蛋白的方法,包括以下步骤:

a) 将权利要求1至4中任一项所述的免疫两亲物溶解在生理pH的水性溶液中并且老化过夜,以使其自组装成免疫纤维;

b) 将含有抗体或Fc融合蛋白的样品与所述免疫纤维混合,并且允许所述免疫纤维结合所述抗体或所述Fc融合蛋白的Fc部分并且在所述水性溶液中形成免疫纤维-抗体复合物或免疫纤维-Fc融合蛋白复合物;

c) 通过添加盐和离心从所述水性溶液中分离所述免疫纤维-抗体复合物或所述免疫纤维-Fc融合蛋白复合物;以及

d) 从所述免疫纤维-抗体复合物或所述免疫纤维-Fc融合蛋白复合物中解离所述免疫纤维,并且收集未结合的抗体或Fc融合蛋白。

6. 如权利要求5所述的方法,其中通过将pH降低至洗脱条件并且过滤或微滤来使所述免疫纤维与所述抗体或所述Fc融合蛋白分离。

用于纯化生物大分子的超分子高亲和力蛋白结合系统

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求于2017年3月30日提交的国际专利申请第62/478,886号的权益,该国际专利申请为了所有目的在此通过引用并入,如同在本文完全阐述一样。

[0003] 对以电子形式提交的材料通过引用的并入

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式经由EFS-Web提交并且在此通过引用以其全部内容并入。创建于2018年3月20日的所述ASCII副本被命名为P14162-02_ST25.txt,并且大小为1,016字节。

[0005] 发明背景

[0006] 通过合成肽或天然存在的肽及其衍生物的自组装形成的超分子一维(1D)纳米结构由于其再生医学、药物递送和疾病诊断中的重要应用在过去三十年中迅速受到越来越多的关注。¹⁻¹⁰例如,Stupp实验室已经通过将直链烃缀合到形成 β -片层的序列上设计并合成了一系列肽两亲物(PA),该肽两亲物可以在生理条件下自组装成超分子纳米纤维。^{2,11-16}为了赋予PA组装体期望的生物活性以与生物学相配合,多个生物活性表位,诸如细胞粘附基序RGD和神经突促进序列IKVAV(SEQ ID NO:2),已经被并入分子设计中。^{13,17-20}在一个实例中,Webber等人研究了在骨髓单核细胞(BMNC)的表面治疗性递送上显示出RGDS(SEQ ID NO:3)表位的生物活性PA纳米纤维,这意味着增强的生物粘附。¹⁴将生物活性肽直接放置在自组装肽基序的C-末端或N-末端处已经成为产生用于特定的生物医学应用的生物活性材料的流行的策略。为了调节肽组装体的免疫原性,Collier和同事将自组装肽Q11共价连接至抗原OVA肽,并且发现所得到的超分子OVA-Q11纳米纤维具有增强的免疫原性。²¹

[0007] 高亲和力抗体结合颗粒和材料在制药工业中迅速受到越来越多的关注,这由对用于生物治疗的单克隆抗体的增加的需求所驱动。²²⁻²⁴蛋白A,一种熟知的抗体结合配体,具有特异性结合来自大多数哺乳动物物种(包括人类)的IgG的Fc部分的能力。²⁵⁻²⁶然而,蛋白A的大尺寸限制了其工业应用,并且因此已经设计并研究了许多合成的和最小化的蛋白A的结构域。²⁷⁻²⁹蛋白A的Z结构域是第一个且是最著名的具有59个氨基酸残基的合成结构域,并且当与IgG1结合时 K_d 为 ~ 10 nM。³⁰⁻³¹为了进一步最小化蛋白A的Z结构域,设计了双螺旋衍生物Z33,而结合亲和力无显著改变($K_d=43$ nM)。²⁷虽然已经鉴定了高亲和力配体,但在期望的底物上呈现配体的方式对于抗体纯化工艺同样重要。在制药工业中,抗体纯化主要依赖于亲和色谱法,亲和色谱法基于抗体结合配体(例如,蛋白A)的高选择性固定但具有高的色谱介质成本和有限的捕获生产率。³²⁻³⁴直到最近,亲和沉淀才通过使用相对简单的工艺提供有效的纯化和潜在的消除瓶颈的批量生产能力(batch throughput)而成为传统色谱方法的有吸引力的替代方法。³⁵⁻³⁸

[0008] 亲和沉淀的典型实例是使用弹性蛋白样蛋白(ELP)融合的Z结构域以通过温度和盐触发的ELP的溶解度转变来沉淀IgG。³⁹⁻⁴⁰然而,细菌表达的ELP的高质量、每个ELP融合的配体上有限的结合位点以及抗体在升高的温度的潜在变性促进了寻找呈现抗体结合配体的新的底物的兴趣。

[0009] 受到自组装肽两亲物的巧妙的分子设计的启发,我们研究了将蛋白A模拟肽Z33并

入自组装免疫两亲物(IA)的方式,并且探索了其在自组装状态下与靶抗体的结合能力。使用等温滴定量热法(ITC)研究了自组装的免疫纤维(IF)和治疗性IgG之间的结合亲和力,表明含有IF的Z33保持其高的IgG结合亲和力。

[0010] 发明概述

[0011] 许多一维(1D)纳米结构通过包含作为芯构建基序的短 β -片层序列的肽或肽缀合物的自组装来构建,所述芯构建基序对于促进所得到的组装体的定向各向异性生长的分子间氢键合至关重要。虽然该分子设计策略已经导致成功地生产了大量用于与细胞接合的有生物活性的丝状 β -片层组装体,但联想到淀粉样蛋白原纤维与潜在毒性相关的担忧已经促进了具有 α -螺旋肽的其他超分子工艺策略。

[0012] 迄今为止,文献中已有大量研究表明,生物活性肽可以成功地并入到超分子肽纳米结构中,同时保持其生物活性。然而,在表位必须保持 α -螺旋构象以便有生物活性的情况下,在使用形成 β -片层的序列和 α -螺旋基序的呈现之间似乎存在间距不相容的问题。在此情况下,本发明人现在示出了蛋白A模拟肽Z33(含有两个 α -螺旋的基序)与直链烃的直接缀合,以产生两种对单克隆抗体具有高结合亲和力的自组装免疫两亲物,并且首次证明了本发明的这些超分子免疫纤维(IF)可以用于沉淀和纯化单克隆抗体免疫球蛋白G(IgG)。

[0013] 根据一些实施方案,本发明包括具有氨基酸序列FNMQQRRFYALHDPNLNNEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1)的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A模拟肽Z33(含有两个 α -螺旋的基序)与直链烃的直接缀合,以产生自组装免疫两亲物。结果示出,所得到的两亲性肽尽管缺乏必需的 β -片层区段,但在生理条件下可以有效地缔合成超分子免疫纤维(IF),同时保持其天然的 α -螺旋构象。等温滴定量热法测量证实,这些自组装免疫纤维可以在pH 7.4以高特异性结合免疫球蛋白G(IgG)抗体,但在pH 2.8的洗脱缓冲液中没有发生可检测的结合。

[0014] 根据一些另外的实施方案,证明了本发明的IF具有pH依赖的特异性结合,这使得能够沉淀和纯化靶IgG抗体。

[0015] 因此,在一些实施方案中,将蛋白结合肽超分子工程化成丝状组装体对于有效的蛋白质纯化是有用的。

[0016] 根据一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽。

[0017] 根据一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽,并且其中该肽当在生理pH的水性溶液中时采用 α -螺旋构象。

[0018] 根据一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽,其中该抗体结合肽具有金黄色葡萄球菌的蛋白A的Z33肽的亲水性氨基酸序列、或其功能部分或片段或衍生物。

[0019] 根据另一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽,其中该抗体结合肽具有氨基酸序列FNMQQRRFYALHDPNLNNEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1)或其功能部分或片段或衍生物。

[0020] 根据另一个实施方案,本发明提供了一种用于纯化抗体或Fc融合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:a)将免疫两亲物溶解在生理pH的水性溶液中并且老化过夜,以使其自组装成免疫纤维(IF);b)将含有抗体或Fc融合蛋白的样品与IF混合,并且允许IF结合抗

体或Fc融合蛋白的Fc部分并且在溶液中形成免疫纤维-抗体复合物或免疫纤维-Fc融合蛋白复合物;c)通过添加盐和离心从溶液中分离免疫纤维-抗体复合物或免疫纤维-Fc融合蛋白复合物;以及d)使IF与抗体或Fc融合蛋白解离,并且收集未结合的抗体或Fc融合蛋白。例如,可以通过将pH降低至洗脱条件并且过滤或微滤来使IF与抗体或Fc融合蛋白分离。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A-图1C。(1A)Z33肽与IgG的Fc部分结合的示意图。(1B)C12-Z33和2C8-Z33的序列。烷基基团和Z33分别用黄色和蓝色阴影区域指示。Z33肽中的两个 α -螺旋被加下划线。(1C)R-Z33 IF的自组装以及IF与IgG之间的结合的示意图。

[0023] 图2A-图2F。(A)C12-Z33的自组装的示意图。(B)Z33肽和C12-Z33分别在pH 7.4和2.8的归一化CD光谱。C12-Z33在pH 7.4(C、D)和2.8(E、F)的TEM表征。TEM样品分别在PBS(pH 7.4)和IgG洗脱缓冲液(pH 2.8)中以100 μ M的浓度制备。将TEM样品用2wt%乙酸铀酰(uranyl acetate)阴性染色。

[0024] 图3A-图3D。将100 μ M C12-Z33在15 $^{\circ}$ C滴定到(A)PBS缓冲液(pH 7.4)和(B)IgG洗脱缓冲液(pH 2.8)中的2 μ M IgG1溶液中的ITC概况。将100 μ M(C)Z33和(D)C12-Z33在15 $^{\circ}$ C滴定到PBS pH 7.4中的2 μ M IgG1的ITC概况。

[0025] 图4A-图4E。2C8-Z33的TEM表征:在(A)pH 7.4的PBS中,直径为 16.8 ± 1.5 nm,以及在(B)pH 2.8的IgG洗脱缓冲液中,直径为 17.3 ± 1.9 nm。TEM样品的制备与C12-Z33的制备类似。(C)100 μ M 2C8-Z33在pH7.4的PBS中的归一化CD光谱示出了 α -螺旋二级结构。将100 μ M 2C8-Z33滴定到(D)PBS缓冲液pH 7.4和(E)IgG洗脱缓冲液pH 2.8中的2 μ M IgG1溶液中的ITC谱。

[0026] 图5A-图5D。通过0.6M Na_2SO_4 溶液触发的IF-IgG复合物的沉淀的示意图。(B)5mM C12-Z33的PBS溶液在(i)添加0.6M Na_2SO_4 之前和(ii)添加0.6M Na_2SO_4 之后的照片,以及含有以下的20 μ M IgG1的PBS溶液的照片:(iii)5mM C12-Z33、(iv)0.6M Na_2SO_4 、以及(v)5mM C12-Z33和0.6M Na_2SO_4 。在(ii)和(v)中观察到沉淀。(C)添加0.6M Na_2SO_4 之前和之后的C12-Z33和IgG1+C12-Z33复合物的吸收光谱。净IgG1的上清液源自IgG1+C12-Z33的上清液减去C12-Z33的上清液。(D)添加0.6M Na_2SO_4 之前和之后的2mM C12-Z33和IgG1+C12-Z33复合物的吸收光谱。

[0027] 图6A-图6D。(A、C)100 μ M C12-Z33和(B、D)100 μ M C12-Z33在与IgG涂覆的Au纳米颗粒在PBS pH 7.4中孵育之后的TEM图像。IgG浓度:0.33 μ M-0.66 μ M。

[0028] 图7。C12-Z33的CMC测量。报告物染料尼罗红在与一系列浓度的C12-Z33孵育之后的发射光谱由Fluorolog荧光计(Jobin Yvon, Edison, NJ)监测。激发波长固定在560nm;在580nm-720nm监测发射光谱。C12-Z33的CMC由发射最大值的蓝移确定,其中转移指示染料分配到组装的纳米结构的疏水性隔室中。此处示出的所有光谱都通过发射最大值归一化。C12-Z33的CMC范围:2 μ M-5 μ M。

[0029] 图8A-图8B。RB-C12-Z33的RP-HPLC(8A)和MALDI-TOF MS(8B)表征。RP-HPLC光谱证实了产物的纯度(>99%)。预期的质量为4838.5。4840.2处的峰对应于 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0030] 图9A-图9D。在PBS pH 7.4中的100 μ M(9A)C12-Z33和(9C)RB-C12-Z33的TEM图像。两种分子分别自组装成具有 11.5 ± 1.5 nm和 13.8 ± 1.8 nm的直径的纳米纤维。在pH 7.4的PBS中的100 μ M(9B)C12-Z33和(9D)RB-C12-Z33纳米纤维的归一化CD光谱分别示出了 β -片层

构象和 α -螺旋构象。

[0031] 图10A-图10C。100 μ M RB-C12-Z33与2 μ M FITC-IgG在PBS(pH 7.4)中孵育的共聚焦荧光图像示出了罗丹明B的荧光信号与FITC的荧光信号的共定位。(A) 罗丹明B荧光的图像。(B) FITC荧光的图像以及(C) (A)和(B)的合并图像。比例尺:20 μ m。

[0032] 发明详述

[0033] 葡萄球菌蛋白A(SPA)是最初在金黄色葡萄球菌的细胞壁中发现的蛋白质。它包括折叠成三螺旋束的五个同源结构域。蛋白A由于其与来自大多数哺乳动物物种(包括人类)的免疫球蛋白G(又称IgG)的Fc部分特异性结合而在免疫学中发挥重要的作用。已经对蛋白A进行了广泛的结构和生化研究。第一个编码SPA的基因在1984年被克隆、测序和表达,随后许多基于蛋白A的合成的和最小化的IgG结合结构域被克隆、测序和表达。其中Z-58结构域是第一个且是最著名的广泛用于亲和色谱法和亲和沉淀的合成结构域。另一个最小化的结合结构域Z-33在1996年获得,分子的功能无显著改变。

[0034] 根据若干个实施方案,本发明提供了用于将SPA的抗体结合结构域的氨基酸序列修饰和/或衍生成用作IF的构建单元的免疫两亲物的方法。本文描述了可用于结合IgG抗体或其部分或片段的IF的设计和产生的实例。一旦在生理pH范围内的水性溶液中形成免疫纤维,表面上显示的暴露的生物活性表位(结合位点)能够特异性地结合IgG。

[0035] 根据一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽。

[0036] 根据一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽,并且其中该免疫两亲物当在生理pH的水性溶液中时具有 α -螺旋构象。

[0037] 根据一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽,其中该抗体结合肽具有金黄色葡萄球菌的蛋白A的Z33肽的亲水性氨基酸序列、或其功能部分或片段或衍生物。

[0038] 根据另一个实施方案,本发明提供了一种免疫两亲物,该免疫两亲物包含与直链烃链缀合的抗体结合肽,其中该抗体结合肽具有氨基酸序列FNMQQRRFYALHDPNLNNEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1)或其功能部分或片段或衍生物。

[0039] 如本文使用的,术语“免疫两亲物”意指可以自发地缔合成被称为“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,结合性质也是pH依赖性的。那些带更多正电荷的IF更容易用较高pH的溶液缔合,并且相反,带负电荷的IF在较低pH的溶液中将更容易缔合。

[0040] 在一些实施方案中,亲水性肽被缀合至具有8个和22个之间的碳的烃尾,并且该亲水性肽是直链的或者可以是支链的。考虑到在水性溶液中的溶解度,碳的数目存在上限。亲水性肽增加了纳米结构的水溶性,并且可以通过优选的二级结构形成,例如 β 片层、 α 螺旋、聚脯氨酸II型螺旋、 β 转角来促进良好界定的纳米结构体系(architecture)的形成,该良好界定的纳米结构体系包括但不限于圆柱形或球形胶束、中空纳米管、螺绕环、盘和囊泡。

[0041] 如本文使用的,术语“抗体结合肽”意指具有以高特异性(诸如具有在约 10^{-6} M至约 10^{-10} M之间的 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。

[0042] 在一些实施方案中,抗体结合肽是金黄色葡萄球菌的蛋白A的Z结构域的Z33双螺

旋衍生肽的亲水性氨基酸序列、或其功能部分或片段或衍生物。

[0043] 如本文使用的,蛋白A的Z33肽具有氨基酸序列FNMQQRRFYALHDPNLNNEEQRNAKIKS IRDD(SEQ ID NO:1)。

[0044] 术语“氨基酸”包括呈D形式或L形式的天然 α -氨基酸(例如,Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Lys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val)、以及 β -氨基酸、合成和非天然氨基酸的残基。许多类型的氨基酸残基可用于多肽,并且本发明不限于天然的、遗传编码的氨基酸。可以在本文描述的肽中使用的氨基酸的实例可以例如在Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc. 以及其中引用的参考文献中找到。大量氨基酸残基的另一个来源由RSP Amino Acids LLC的网站提供。

[0045] 本文提及的“衍生物”包括本发明的创造性抗体结合肽的部分(parts)、片段和部分(portions)。衍生物还包括单个或多个氨基酸取代、缺失和/或添加。同源物包括与来自同一物种的蛇或来自同一属或科的蛇的毒液在功能上、结构上或立体化学上相似的肽。所有这样的同源物被本发明所预期。

[0046] 类似物和模拟物包括这样的分子,该分子包括包含非天然存在的氨基酸的分子或不包含氨基酸但在功能上与肽表现相同的分子。天然产物筛选是用于鉴定类似物和模拟物的一种有用的策略。

[0047] 在肽合成期间并入非天然氨基酸和衍生物的实例包括,但不限于使用以下:正亮氨酸、4-氨基丁酸、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸、6-氨基己酸、叔丁基甘氨酸、正缬氨酸、苯基甘氨酸、鸟氨酸、肌氨酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸、2-噻吩基丙氨酸和/或氨基酸的D-异构体。本文预期的已知的非天然氨基酸的部分列表在表1中示出。

[0048] 表1:非天然氨基酸

非常规氨基酸	代码	非常规氨基酸	代码
α -氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α -氨基-a-甲基丁酸酯	Mgab	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
氨基环丙烷-	Cpro	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn

[0050]

羧酸酯		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
氨基降冰片基- 羧酸酯	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
环己基丙氨酸		Chexa L-N-甲基组氨酸	Nmhis
环戊基丙氨酸	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Dasp	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基叔丁基甘氨酸	Nmtbug
D-苏氨酸	Dthr	L-正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α -甲基氨基异丁酸酯	Maib
D-缬氨酸	Dval	α -甲基- γ -氨基丁酸酯	Mgabv
D- α -甲基丙氨酸	Dmala	α -甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D- α -甲基精氨酸	Dmarg	α -甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D- α -甲基天冬酰胺	Dmasn	α -甲基- α -萘基丙氨酸	Manap
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasp	α -甲基青霉胺	Mpen
D- α -甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基谷氨酰胺	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D- α -甲基组氨酸	Dmhis	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn

[0051]

D- α -甲基异亮氨酸	Dmile	N-氨基- α -甲基丁酸酯	Nmaabu
D- α -甲基亮氨酸	Dmleu	α -萘基丙氨酸	Anap
D- α -甲基赖氨酸	Dmlys	N-苄基甘氨酸	Nphe
D- α -甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氨基甲酰基乙基)甘氨酸	Ngln
D- α -甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氨基甲酰基甲基)甘氨酸	Nasn
D- α -甲基苯丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D- α -甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D- α -甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D- α -甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D- α -甲基酪氨酸	Dmtyr	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D- α -甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D-N-甲基丙氨酸	Dnmala	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D-N-甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D-N-甲基天冬酰胺	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D-N-甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-二苯基乙基)甘氨酸	Nbhm
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-(3,3-二苯基丙基)甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmglu	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟乙基)甘氨酸	Nser
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基丁酸酯	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯丙氨酸	Dnmphe
N-甲基氨基异丁酸酯	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基-萘基丙氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen

γ -氨基丁酸	Gabu	N-(对羟基苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-叔丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫代甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉素	Pen
L-高苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬酰胺	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-叔丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -甲基组氨酸	Mhis	L- α -甲基高苯丙氨酸	Mhphe
L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲硫基乙基)甘氨酸	Nmet
L- α -甲基亮氨酸	Mleu	L- α -甲基赖氨酸	Mlys
L- α -甲基甲硫氨酸	Mmet	L- α -甲基正亮氨酸	Mnle
L- α -甲基正缬氨酸	Mnva	L- α -甲基鸟氨酸	Morn
L- α -甲基苯丙氨酸	Mphe	L- α -甲基脯氨酸	Mpro
L- α -甲基丝氨酸	Mser	L- α -甲基苏氨酸	Mthr
L- α -甲基色氨酸	Mtrp	L- α -甲基酪氨酸	Mtyr
L- α -甲基缬氨酸	Mval	L-N-甲基高苯丙氨酸	Nmhphe
N-(N-(2,2-二苯基乙基)氨基甲酰甲基)甘氨酸	Nnbhm	N-(N-(3,3-二苯基丙基)氨基甲酰基甲基)甘氨酸	Nnbhe
1-羧基-1-(2,2-二苯基-乙基氨基)环丙烷	Nmbc		

[0053] 本文预期的本主题的肽的类似物包括对侧链的修饰、在肽合成期间并入非天然氨基酸和/或其衍生物、和使用交联剂以及对肽分子或其类似物施加构象限制的其他方法。

[0054] 本发明预期的侧链修饰的实例包括氨基基团的修饰,诸如通过与醛反应随后用 NaBH_4 还原的还原烷基化;用乙酰亚胺甲酯(methylacetimidate)的脒化;用乙酸酐的酰化;用氰酸酯的氨基基团的氨基甲酰化;用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)的氨基基团的三硝基苄基化;用琥珀酸酐和四氢邻苯二甲酸酐的氨基基团的酰化;以及用吡哆醛-5-磷酸酯随后用 NaBH_4 进行还原的赖氨酸的吡哆醛化(pyridoxylation)。

[0055] 精氨酸残基的胍基团可以通过与试剂诸如2,3-丁二酮、甲酰甲醛(phenylglyoxal)和乙二醛形成杂环缩合产物来修饰。

[0056] 羧基基团可以通过经由O-酰基异脲形成进行碳二亚胺活化,随后通过后续衍生化成,例如对应的酰胺来修饰。

[0057] 巯基基团可以通过诸如以下的方法来修饰:用碘乙酸或碘乙酰胺的羧甲基化;过甲酸氧化成磺基丙氨酸;与其他硫醇化合物形成混合的二硫化物;与马来酰亚胺、马来酸酐或其他被取代的马来酰亚胺反应;使用4-氯汞苯甲酸酯、4-氯汞苯磺酸、氯化苯汞、2-氯汞

基-4-硝基苯酚和其他汞类形成汞衍生物;在碱性pH用氰酸酯的氨基甲酰化。

[0058] 色氨酸残基可以通过例如用N-溴代琥珀酰亚胺进行的氧化或用2-羟基-5-硝基苄基溴或磺酰卤进行的吲哚环的烷基化来修饰。在另一方面,酪氨酸残基可以通过用四硝基甲烷进行的硝化来改变,以形成3-硝基酪氨酸衍生物。

[0059] 组氨酸残基的咪唑环的修饰可以通过用碘乙酸衍生物进行的烷基化或用焦碳酸二乙酯进行的N-乙酯基化来完成。

[0060] 交联剂可以被用于例如,使用同-双官能交联剂诸如具有 $(CH_2)_n$ 间隔基团($n=1$ 至 $n=6$)的双官能酰亚胺酯、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯和异-双官能试剂来稳定3D构象,该异-双官能试剂通常包含氨基反应性部分诸如N-羟基琥珀酰亚胺和另一基团特异性反应性部分诸如马来酰亚胺基或二硫代部分(SH)或碳二亚胺(COOH)。另外,肽可以通过例如以下在构象上被限制:并入 C_α -甲基氨基酸和 N_α -甲基氨基酸、在氨基酸的 C_α 原子和 C_β 原子之间引入双键以及通过引入共价键诸如在N末端和C末端之间、在两条侧链之间或在侧链和N末端或C末端之间形成酰胺键来形成环状肽或类似物。

[0061] 如本文使用的术语“肽”包括长度为4个至100个氨基酸残基、优选地长度为约10个至80个残基、更优选地长度为15个至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。

[0062] 根据一些其他实施方案,可以使用若干过滤方法,诸如例如渗滤,从结合的抗体中分离免疫纤维。

[0063] 根据一些实施方案,本发明总体上提供了用于纯化抗体或Fc融合蛋白的方法,所述方法通过将样品中的抗体或Fc融合蛋白与本发明的免疫纤维在生理pH的水性溶液中混合,并且允许免疫纤维结合抗体或Fc融合蛋白的Fc部分。在一些实施方案中,免疫纤维包含蛋白A的Z33部分,并且对抗体的Fc部分是特异性的。在允许免疫纤维结合的一定时间段之后,免疫纤维在溶液中形成免疫纤维-抗体复合物或免疫纤维-Fc融合蛋白复合物。然后形成的复合物可以通过许多已知的分离手段(包括例如盐诱导的沉淀和离心)与样品中未结合的免疫纤维和抗体或Fc融合蛋白以及其他组分分离。分离的复合物然后可以被引入到酸性pH的另一溶液中,在该溶液中免疫纤维失去其对抗体或Fc融合蛋白的结合亲和力。抗体或Fc融合蛋白然后可以通过过滤(诸如渗滤或其他手段)从解离的免疫纤维中分离,并且解离的单体也可以被除去。

[0064] 如本文使用的,术语“样品”意指含有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Fc融合蛋白的任何样品或溶液或流体或混合物。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、细胞裂解物和澄清体(clarified bulk)(例如,澄清的细胞培养物上清液)。任选地,样品从表达感兴趣的抗体或Fc融合蛋白的宿主细胞或生物体产生(天然地或重组地)。例如,细胞培养物中的细胞包括用含有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。这些宿主细胞可以在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。细菌宿主细胞包括但不限于大肠杆菌(E. coli)细胞。合适的大肠杆菌菌株的实例包括:HB101、DH5 α 、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539和不能裂解外来DNA的任何大肠杆菌菌株。可以使用的真菌宿主细胞包括但不限于,酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)和曲霉属(Aspergillus)细胞。可以使用的昆虫细胞包括但不限于,家蚕(Bombyx mori)、

Mamestra drassicae、草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)。许多哺乳动物细胞系是合适的宿主细胞,包括例如CHO、COS、PER.C6、TM4、VER0076、DXB11、MDCK、BRL-3A、W138、Hep G2、MMT、MRC 5、FS4、CHO、293T、A431、3T3、CV-1、C3H10T1/2、Colo205、293、HeLa、L细胞、BHK、HL-60、FRhL-2、U937、HaK、Jurkat细胞、Rat2、BaF3、32D、FDCP-1、PC12、M1x、鼠骨髓瘤(例如,SP2/0和NS0)和C2C12细胞,以及转化的灵长类动物细胞系、杂交瘤、正常二倍体细胞和源自初级组织和初级外植体的体外培养的细胞株。

[0065] 根据本发明的一个或更多个实施方案,将理解,术语“生物样品”或“生物流体”包括但不限于来自活的或以前活的患者或哺乳动物或来自培养的细胞的任何量的物质。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、淋巴液、淋巴结、滑液组织、软骨细胞、滑膜巨噬细胞、内皮细胞、皮肤、细胞培养物、细胞裂解物和澄清液(例如,澄清的细胞培养物上清液)。

[0066] 在本发明的某些特定实施方案中,使用本发明纯化的蛋白质是抗体。术语“抗体”以最广泛的含义使用以涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、抗体片段、免疫粘附素和抗体-免疫粘附素嵌合体。

[0067] “抗体片段”包括抗体的至少Fc部分,并且通常包括抗原结合区或其可变区。

[0068] 术语“单克隆抗体”以常规含义使用,是指从抗体的实质上同质的群体获得的抗体,使得除了可能少量存在的可能的天然存在的突变之外构成该群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体针对单一抗原位点是高度特异性的。然而与通常包括针对不同的抗原决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比,单克隆抗体对抗原的单一决定子。术语“单克隆”在描述抗体时指示抗体的特征在于从抗体的实质上同质的群体获得,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,在本发明中使用的单克隆抗体可以使用Kohler等人,Nature 256:495(1975)首次描述的常规杂交瘤技术产生,或者它们可以使用重组DNA方法制备(参见,例如,美国专利第4,816,567号)。单克隆抗体还可以例如使用以下中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离:Clackson等人,Nature 352:624-628(1991); Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1991);以及美国专利第5,223,409号;第5,403,484号;第5,571,698号;第5,427,908号;第5,580,717号;第5,969,108号;第6,172,197号;第5,885,793号;第6,521,404号;第6,544,731号;第6,555,313号;第6,582,915号;和第6,593,081号。

[0069] 本文描述的单克隆抗体包括“嵌合”和“人源化”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及这样的抗体的片段,只要它们表现出期望的生物活性(美国专利第4,816,567号;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。非人类(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有源自非人类免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体是具有期望的特异性、亲和力和能力的人类免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的高变区残基被来自非人类物种(供体抗体)的高变区残基取代,所述非人类物种诸如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物。在一些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人类残基取代。此外,人源化抗体可以包含不存在于受体抗体或供体抗体中的残基。进

行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个并且通常是两个可变结构域的大体上全部,其中全部或大体上全部高变环对应于非人类免疫球蛋白的那些,并且全部或大体上全部FR区是人类免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人类免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。对于进一步的细节,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0070] 本文描述的单克隆抗体还包括“人类”抗体,其可以从各种来源分离,包括例如从人类患者的血液中分离,或者使用转基因动物重组地制备。这样的转基因动物的实例包括具有人类重链转基因和人类轻链转染色体(transchromosome)的**KM-MOUSE®**(Medarex,Inc.,Princeton,NJ)(参见W0 02/43478)、**XENOMOUSE®**(Abgenix,Inc.,Fremont CA;在例如Kucherlapati等人的美国专利第5,939,598号;第6,075,181号;第6,114,598号;第6,150,584号和第6,162,963号中描述的)、以及**HUMAB-MOUSE®**(Medarex,Inc.;在例如以下中描述的:Taylor,L.等人(1992)Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen,J.等人(1993)International Immunology 5:647-656;Tuailon等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:3720-3724;Choi等人(1993)Nature Genetics 4:117-123;Chen,J.等人(1993)EMBO J.12:821-830;Tuailon等人(1994)J.Immunol.152:2912-2920;Taylor,L.等人(1994)International Immunology 6:579-591;和Fishwild,D.等人(1996)Nature Biotechnology 14:845-851;美国专利第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,789,650号;第5,877,397号;第5,661,016号;第5,814,318号;第5,874,299号;和第5,770,429号;第5,545,807号;以及PCT公布第W0 92/03918号、第W0 93/12227号、第W0 94/25585号、第W0 97/13852号、第W0 98/24884号和第W0 99/45962号、Korman等人的第W0 01/14424号)。本发明的人类单克隆抗体也可以使用SCID小鼠来制备,其中人类免疫细胞已经被重构至SCID小鼠中,使得在免疫后可以产生人类抗体应答。这样的小鼠在例如Wilson等人的美国专利第5,476,996号和第5,698,767号中描述。

实施例

[0071] 材料。所有Fmoc氨基酸和树脂均购自Advanced Automated Peptide Protein Technologies(AAPPTEC,Louisville,KY,USA),并且Fmoc-Lys(Fmoc)从Novabiochem(San Diego,CA,USA)获得。治疗性人IgG1(IgG1)从Bristol-Myers Squibb(Boston,MA,USA)获得,并且IgG洗脱缓冲液来源于Thermo Fisher Scientific(Rockford,IL,USA)。所有其他试剂均从VWR(Radnor,PA,USA)获得,并且在不经进一步纯化的情况下按原样使用。

[0072] 分子合成。使用类似的方法合成C12-Z33和2C8-Z33免疫两亲物。简言之,Z33肽首先在Focus XC自动肽合成器(AAPPTEC,Louisville,KY)上使用标准的9-芴基甲氧羰基(Fmoc)固相合成方案来合成。然后将C12(或2C8)烷基链与相对于Z33肽为4(或8):4:6比率的月桂酸(或辛酸)/HBTU/DIEA手动地偶联在Z33肽的N-末端(在Fmoc除去之后),在室温震荡过夜。使用在DMF溶液中的20%4-甲基哌啶进行Fmoc脱保护持续10分钟,重复一次。在所有情况下,通过茚三酮测试(Anaspec Inc.,Fremont,CA)监测反应的游离胺。使用以92.5:

5:2.5比率的TFA/TIS/H₂O的混合物将完成的肽从固体支持物裂解2.5小时。通过旋转蒸发除去过量的TFA,并且添加冷的乙醚以沉淀粗肽。通过离心方法,以6000rpm分离沉淀的肽和乙醚持续3分钟。将肽用乙醚再洗涤2次,并且通过离心除去溶液。

[0073] 在配备有级分收集器的Varian ProStar 325型制备型HPLC(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)上,在25℃使用Varian聚合柱(PLRP-S,100Å,10μm,150×25mm)通过制备型RP-HPLC纯化IA。含有0.1%v/v TFA的水/乙腈梯度被用作洗脱剂,流速为20ml/min。监测Z33肽区段在220nm处的吸光度峰。将粗材料溶解在20ml的0.1%水性TFA中,并且每次纯化运行用10ml注射液进行。通过MALDI-ToF(BrukerAutoflex III MALDI-ToF仪器,Billerica,MA)分析收集的级分,并且将含有期望的产物的那些级分冻干(FreezeZone-105℃4.5L冷冻干燥器,Labconco,Kansas City,MO),并且储存在-30℃。

[0074] 免疫两亲物的自组装和TEM成像。将1mM浓度的免疫两亲物用HFIP预处理,并且然后溶解在1×PBS或去离子水中,并且在室温老化过夜;将10μl的10倍稀释的样品点在具有400平方目的碳膜铜载网(grid)(来自EMS:Electron Microscopy Sciences)上,并且将过量部分用滤纸除去以在载网上留下样品的薄膜。在让样品干燥5分钟之后,将10μl的2%乙酸铀酰添加至样品载网中,并且在30秒之后除去过量部分。在TEM成像之前将所有样品干燥至少3小时。

[0075] 圆二色谱(CD)。两个自组装的样品的CD实验在Jasco J-710分光偏振计(JASCO,Easton,MD,USA)上使用1mm路径长度的石英UV-Vis吸收池(ThermoFisher Scientific,Pittsburgh,PA,USA)在25℃进行。在实验之前,将样品立即从1mM储备溶液稀释至1×PBS中的100μM。光谱在190nm-280nm的波长范围内作为三次扫描的平均值收集。获得溶剂的背景光谱,并且从样品光谱中减去。将收集的数据相对于样品浓度归一化。

[0076] ITC实验。等温滴定量热法实验使用高精度VP-ITC滴定量热系统(Microcal Inc.)进行。在15℃用在1×PBS(pH 7.4或2.8)中的免疫两亲物滴定IgG1溶液。对于0.1%(1mg/ml)IgG溶液,使用在280nm的1.4的质量消光系数(mass extinction coefficient)来计算IgG1浓度。免疫两亲物的浓度通过总氮测定来确定(Anal.Biochem.,61.2(1974):623-627)。每次注射之后释放的热量通过量热信号的积分获得。与免疫两亲物结合至IgG1相关的热量通过减去稀释的热量获得。数据的分析使用MicroCal Origin™包进行。

[0077] 实施例1

[0078] 全长Z33免疫两亲物的分子设计。这种两亲性肽缀合物(诸如肽两亲物、肽-聚合物缀合物、肽-药物缀合物等)的构建已经被广泛地用于产生多种超分子纳米结构。由亲水性Z33肽序列(FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD)(SEQ ID NO:1)和疏水性烷基链组成的IgG结合免疫两亲物被设计为用作免疫纤维(IF)的构建基序。Z33肽是来自蛋白A的双螺旋衍生物(图1A),其以高结合亲和力(K_d=43nM)特异性地结合至IgG的Fc部分。^{28,41-42}

[0079] 经由将月桂酸部分(C12)或两个辛酸部分(2C8)直接缀合至Z33肽的N-端合成了两种IA,C12-Z33和2C8-Z33(图1B)。如图1C所示,预期IA自组装成IF,并且特异性地结合来自抗体混合物溶液的IgG。还合成了纯的Z33肽,以比较Z33分子与含Z33的IF之间的生物活性。另一对照分子C12-Z33是通过将C12缀合至具有加扰序列(scrambled sequence)的Z33的N-末端设计的。所有分子均使用自动固相肽合成(SPPS)方法和RP-HPLC来合成和纯化。合成的化合物的纯度和预期的分子量使用分析型HPLC和质谱法证实。

[0080] 实施例2

[0081] 全长Z33免疫两亲物实施方案的分子自组装和表征。两种IA的自组装可以通过两步操作容易地实现。首先,将IA分别在六氟异丙醇(HFIP)中预处理,以消除任何可能影响其溶解度和自组装形态的均匀性的预先存在的纳米结构。第二,经由蒸发除去HFIP,接着后续添加去离子水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)以达到1mM的最终浓度。IF由通过疏水相互作用被捕获在IF的芯中的烷基链段和在面向溶剂的壳中显示的生物活性Z33序列来形成(图2A)。在室温老化过夜之后,利用透射电子显微镜(TEM)和圆二色谱(CD)来表征组装的纳米结构的形态。

[0082] 鉴于pH条件在本发明的IgG纯化方法中的重要作用,评估了C12-Z33响应于pH变化的自组装行为。通常,中性pH一般用作结合条件,而酸性pH用于从蛋白A亲和柱洗脱抗体。^{32,34}为了研究在中性pH和低pH的自组装行为,PBS(pH 7.4)和IgG洗脱缓冲液(pH 2.8)被用作作用于C12-Z33的自组装的水性环境。通过TEM(图2C至图2F)和CD(图2B)研究了C12-Z33IF在不同pH的形态。发现在上文提及的两种pH条件下,C12-Z33分子能够很好地溶解并且自组装成纳米纤维。来自100 μ M C12-Z33的溶液的代表性TEM图像揭示,C12-Z33在生理条件和酸性条件下都能自组装成纳米纤维结构,直径为 16.0 ± 1.7 nm,该值小于完全延伸的肽分子的长度(β -片层构象为约22.5nm)。纳米纤维的长度以微米尺度示出并且不能被良好地控制。为了进一步理解自组装的结构内的分子堆积,使用圆二色谱(CD)研究肽二级结构。在C12-Z33中观察到在约222nm($n-\pi^*$)和208nm($\pi-\pi^*$)处的强阴性信号,表明处于自组装状态的Z33区段的 α -螺旋二级结构的形成,如同纯的Z33肽所示。基于IF的CD光谱和测量的直径,合理地推断出肽在堆积成IF时保持其 α -螺旋二级结构。值得注意的是,尽管在PBS溶液或IgG洗脱缓冲液中的C12-Z33的CD光谱仅保持部分 α -螺旋信号,但与在相同缓冲液中的Z33肽相比,在约222nm和208nm处的两个负峰的椭圆率改变。CD光谱的位移可能是由于IF的形成,IF可以改变Z33区段的分子堆积使其脱离游离状态,并且随后可以由于结合位点所需的特定构象影响其对IgG的结合亲和力。

[0083] 实施例3

[0084] 用于测量IF的结合亲和力的ITC实验。鉴于Z33肽在并入IF之后二级结构的构象变化,有极大兴趣知道C12-Z33 IF的形成是否将影响原始Z33肽中存在的IgG结合能力。为了研究自组装的C12-Z33 IF的结合亲和力,通过等温滴定量热法(ITC)研究了与IgG1结合的热力学性质。ITC已经被广泛地用于监测大量蛋白质和配体之间的结合事件,⁴³⁻⁴⁵它是探索C12-Z33 IF和IgG1之间是否可以发生结合的优异的方法。⁴⁶⁻⁴⁷与结合反应相关的热量在逐步注射期间被记录,并且热力学参数,包括热力学解离常数(K_d)、摩尔焓变(ΔH°)和化学计量(N),可以直接获得。⁴⁴

[0085] 表1. 在15 $^\circ$ C在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水中,基于Z33的配体与IgG1的结合的热力学参数。数据按照配体报告。

	配体	K_d (nM)	ΔG° (kcal \cdot mol $^{-1}$)	ΔH° (kcal \cdot mol $^{-1}$)	$-T\Delta S^\circ$ (kcal \cdot mol $^{-1}$)	N
[0086]	Z33	60	-9.5	-23.1	13.6	2.31
	C12-Z33	650	-8.1	-9.3	1.2	3.10
	2C8-Z33	1115	-7.8	-2.8	-5.0	9.13

[0087] 表2. 在15°C在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水中, 基于Z33的配体与IgG1的结的热力学参数。数据按照IgG1报告。

	配体	K_d (nM)	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)	ΔH° (kcal·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kcal·mol ⁻¹)
[0088]	Z33	26	-10.0	-53.4	43.4
	C12-Z33	209	-8.8	-28.9	20.1
	2C8-Z33	122	-9.1	-25.9	16.8

[0089] 在典型的ITC实验中, 将在PBS缓冲液中的100 μ M C12-Z33的溶液老化过夜, 并且然后在15°C注射到在pH 7.4的相同缓冲液中的2 μ M IgG1的溶液中。典型的热谱图和结合等温线在图3A中示出, 并且按照配体报告的热力学参数总结在表1中。C12-Z33 IF与IgG1结合的ITC结果揭示了焓驱动的结合事件, 其特征在于650的 K_d 。为了进一步比较C12-Z33 IF的结合效率, 我们合成了Z33肽, 其被证明与IgG1紧密结合, 通过表面等离子体共振测量的 K_d 为43nM。Z33肽与IgG1的结合性质在15°C在pH7.4的PBS中通过ITC测量, 并且典型的热谱图和结合等温线在图3C中示出。除了提高100倍的亲和力之外, Z33的化学计量是2.3, 而C12-Z33的表观化学计量是3.1, 这指示IF中并非所有的C12-Z33都可用于与IgG1分子结合。C12-Z33分子能够与IgG1结合的效率可以通过将Z33的化学计量除以C12-Z33的化学计量评估为74.2%。

[0090] 虽然按照配体的归一化允许确定结合的表观化学计量, 但热力学参数的比较应在对每摩尔IgG归一化之后进行, 如表2所示。Z33与IgG的结合的特征在于与大的不利熵变相对的大的有利焓变。尽管焓变和熵变的幅度较小, 但C12-Z33的结合的热力学特征类似。尽管C12-Z33相比于Z33以较小的不利熵结合, 但有利焓的损失甚至更大, 这导致总体较低的结合亲和力。有利结合焓的总体损失可能是由与IF破坏相关的不利熵引起的。由于IF中的限制, 存在与IgG1的有利相互作用受到限制的可能性。用C12-Z33滴定IgG1也在15°C在IgG洗脱缓冲液(pH 2.8)中进行(图3B), 以便证明在适合于从IF中洗脱的该低pH下显著较低的结合亲和力。

[0091] 为了排除IF和IgG1之间的非特异性结合, 具有加扰Z33肽序列的C12-Z33被用作阴性对照。该C12-Z33 IA示出类似的自组装性质和用TEM和CD表征的二级结构(数据未示出)。ITC实验通过以下进行: 将100 μ M C12-Z33 IA在15°C注射到在pH 7.4的PBS中的2 μ M IgG1溶液中, 以测量它们的结合能力。图3D中的热谱图和结合等温线表明了IgG1和Z33肽之间的特异性相互作用。

[0092] 实施例4

[0093] 为了进一步证明IF功能的普遍性, 还研究了双链烷基化的IA 2C8-Z33的从自组装性质到与IgG1的结合亲和力(图4A-图E)。在TEM图像中观察到具有均匀直径的纳米级IF, 并且通过CD证实了 α -螺旋二级结构。根据ITC结果, 2C8-Z33和IgG1之间的结合在15°C在PBS pH 7.4中发生, 而在洗脱缓冲液pH 2.8中没有可检测的结合发生。2C8-Z33的结合的表观化学计量是9.1, 指示甚至更低的结合效率。尽管2C8-Z33相比于C12-Z33以较不利的结合焓结合, 但熵的贡献是没那么不利的, 这导致稍好的结合亲和力(表2)。根据上文讨论的结果, 我们证明了在表面显示高密度的结合位点的情况下, 自组装的IF能够保持与IgG1的有利结合能力, 如同原始的Z33肽所示。然而, 观察到IF的总体结合亲和力的损失, 这是由焓所致

的。有利焓的损失可以通过由于IF中的限制导致的相互作用的损失和与颗粒的破坏相关的不利焓贡献来解释。IF内的分子水平堆积决定了它们的形态性质以及功能性质,这些性质可以极大地影响它们的生物活性性能。

[0094] 实施例5

[0095] IgG分子的纯化的潜在应用。

[0096] 组成氨基酸的多样性为自组装肽纳米纤维之间的非共价相互作用提供了广泛的基础,所述非共价相互作用包括氢键合、 π - π 堆叠、疏水塌陷 (hydrophobic collapse) 和静电相互作用。例如,酸性氨基酸和碱性氨基酸的溶解度由离子化程度决定,离子化程度是依赖pH和离子强度的性质。因此,可以通过调节pH或添加盐来减少静电排斥、促进聚集以及甚至沉淀来促进带电荷的肽的自组装过程。考虑到Z33肽中显示的大量带电荷的氨基酸残基,本发明的创造性免疫纤维系统的吸引人的优点在于简单可调的溶解度。一旦IgG与IF结合,通过添加具有高离子强度的盐,IgG-IF复合物具有被沉淀出来的高潜力(图5A)。

[0097] 因为C12-Z33 IF的相对高的与IgG1的结合亲和力,选择C12-Z33 IF来研究沉淀IgG1的可能性。如图5B(i-ii)所示,5mM C12-Z33可以充分溶解在PBS溶液中,但在0.6M Na_2SO_4 的PBS溶液中沉淀。C12-Z33在PBS溶液中的 ζ 电位是-7.61mV,并且 Na_2SO_4 的添加可以屏蔽IF表面上的电荷,并且由此诱导沉淀。对于IgG1,它充分溶解在5mM C12-Z33以及0.6M Na_2SO_4 中。然而,在将20 μM IgG1和5mM C12-Z33混合5分钟,随后添加0.6M Na_2SO_4 之后,观察到沉淀。为了确定沉淀物的组成,进行两个平行实验。将在0.6M Na_2SO_4 中的5mM C12-Z33离心,并且使用紫外-可见(UV-Vis)光谱监测添加 Na_2SO_4 之前和之后的上清液在280nm处的吸光度变化。对在0.6M Na_2SO_4 中的5mM C12-Z33和20 μM IgG1的混合物进行相同的程序。如图5C所示,大多数C12-Z33 IF能够被0.6M Na_2SO_4 沉淀出来。对于IgG1-IF复合物系统,280nm处的吸光度降低至低于IgG1的初始吸光度的水平,指示IgG1从溶液中除去。更清楚地,经由从蓝线中减去绿线的值来绘制净IgG1的上清液的吸光度,表明多于60%的IgG1从上清液中除去。目前为止,我们的IF用作新型亲和沉淀剂的可能性得到了初步证明。

[0098] 实施例6

[0099] IgG与本发明的IF结合的确证。

[0100] 在TEM中鉴定IgG结构的困难限制了免疫纤维和IgG之间直接结合的可视化。为了证实IgG存在于免疫纤维的表面上,将预形成的C12-Z33和C12-Z33免疫纤维分别与10nm IgG标记的Au纳米颗粒孵育2h。将每种溶液的液滴放置在TEM载网上之后,将载网用滤纸吸干并且放置自然干燥。然后,我们用PBS缓冲液仔细洗涤载网3次,试图在用乙酸铀酰染色样品之前除去未结合的Au纳米颗粒。与IgG涂覆的Au纳米颗粒孵育的C12-Z33在致密和稀疏(图6A和图6C)的区域中的TEM图像证实了IgG与存在Z33的纳米纤维的表面的结合。观察到非常少的Au纳米颗粒附接到具有加扰Z33序列的对照纳米纤维(图6B和图6D)。该研究表明,C12-Z33免疫纤维和IgG涂覆的Au纳米颗粒的共定位确实是特异性结合的结果。应注意,Au纳米颗粒的密度在长的免疫纤维上是相对低的,这可能是由于Z33免疫两亲物在其自组装成纳米纤维之后紧密堆积的可及性有限。另一种可能性是,IgG涂覆的Au纳米颗粒可以结合至单体状态的C12-Z33,并且然后在洗涤步骤中被带走,因为IgG涂覆的Au纳米颗粒中的IgG浓度(0.33 μM -0.66 μM)低于C12-Z33的临界胶束浓度值(其为2 μM -5 μM) (图7)。

[0101] 实施例7

[0102] IgG与本发明的IF相互作用的可视化。

[0103] 为了更好地可视化C12-Z33免疫纤维和IgG之间的相互作用,用荧光染料(罗丹明B)标记C12-Z33允许荧光免疫纤维和FITC-IgG在共聚焦激光扫描显微镜下直接成像。罗丹明B已经被广泛地用于染色生物材料。罗丹明B标记的C12-Z33 (RB-C12-Z33)通过将赖氨酸添加到Z33的N-末端来合成(图8)。罗丹明B和C12分别缀合至新添加的赖氨酸的侧链和主链上的胺基团。因为染料在与C12一起自组装成免疫纤维之后将留在疏水性芯中并且它远离结合序列Z33被定位,因此假定荧光标记将不干扰C12-Z33的结合能力。使用TEM证实了PBS中的自组装的纤维的形态(图9C)。由1mM储备溶液稀释的100 μ M RB-C12-Z33和2 μ M FITC-IgG在PBS中预混合。在即将成像之前,将30 μ l溶液点在干净的显微镜载玻片上,并且用盖玻片覆盖以获得液体薄层。然后通过共聚焦激光扫描显微镜拍摄荧光图像(图10A-图10C),并且荧光图像示出了来自RB-C12-Z33(红色)和FITC-IgG(绿色)两者的荧光信号的共定位。发现FITC-IgG形成了在纯FITC-IgG溶液和在相同条件下与C12-Z33一起孵育的溶液中从未观察到的大的明亮的组装体(数据未示出)。相比于FITC-IgG与RB-C12-Z33孵育时的明亮的荧光,在PBS溶液中或在与C12-Z33孵育之后检测到低的荧光信号。这示出FITC-IgG在PBS缓冲液中或在C12-Z33的存在下分散良好,同时RB-C12-Z33和FITC-IgG之间的结合诱导FITC-IgG的聚集和强荧光。

[0104] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利在此通过引用并入本文,其程度如同每个参考文献被单独和具体地指出通过引用并入并且以其全部内容在本文中列出。

[0105] 除非本文另有指示或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(特别是在以下权利要求书的上下文中)使用的术语“一(a)”和“一(an)”以及“该(the)”和相似的指示词,被解释为覆盖单数和复数二者。除非另有说明,否则术语“包含/包括(comprising)”,“具有(having)”,“包括/包含(including)”和“包含(containing)”被解释为开放式术语(即,意指“包括但不限于”)。除非本文另有指示,否则本文中对值的范围的描述仅意图用作单独地提及落在范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独的值被并入本说明书中,如同在本文中被单独地叙述一样。可以以任何合适的顺序进行本文描述的所有方法,除非本文另有指示或以其他方式与上下文明显矛盾。除非另有说明,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅意图更好地阐明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。本说明书中的语言不应被解释为指出任何未被要求保护的要素对于本发明的实施是必需的。

[0106] 本文描述了本发明优选的实施方案,包括本发明人己知的用于实施本发明的最佳方式。在阅读前面的描述之后,这些优选的实施方案的变化对本领域普通技术人员可能变得明显。本发明人预期本领域技术人员适当地使用这样的变化,并且本发明人意图以不同于本文具体描述的方式实施本发明。因此,本发明包括被适用法律许可的所附权利要求书中叙述的主题的所有修改和等效物。此外,除非本文另有指示或者以其他方式与上下文明显矛盾,否则本发明包括上文描述的要素以其所有可能的变化的任何组合。

[0107] 参考文献

[0108] 1. Altunbas, A.; Lee, S. J.; Rajasekaran, S. A.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J., Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable

drug delivery vehicles. *Biomaterials* 2011,32(25),5906-14.

[0109] 2. Chow, L. W.; Wang, L. J.; Kaufman, D. B.; Stupp, S. I., Self-assembling nanostructures to deliver angiogenic factors to pancreatic islets. *Biomaterials* 2010,31(24),6154-61.

[0110] 3. Koutsopoulos, S.; Zhang, S., Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *J Control Release* 2012,160(3),451-8.

[0111] 4. Lock, L. L.; Reyes, C. D.; Zhang, P. C.; Cui, H. G., Tuning Cellular Uptake of Molecular Probes by Rational Design of Their Assembly into Supramolecular Nanoprobes. *Journal of the American Chemical Society* 2016,138(10),3533-3540.

[0112] 5. 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(8),2907-2910.

[0113] 6. Hu, Y.; Lin, R.; Patel, K.; Cheetham, A. G.; Kan, C. Y.; Cui, H. G., Spatiotemporal control of the creation and immolation of peptide assemblies. *Coordination Chemistry Reviews* 2016,320,2-17.

[0114] 7. Ma, W.; Cheetham, A. G.; Cui, H. G., Building nanostructures with drugs. *Nano Today* 2016,11(1),13-30.

[0115] 8. Black, M.; Trent, A.; Kostenko, Y.; Lee, J. S.; Olive, C.; Tirrell, M., Self-Assembled Peptide Amphiphile Micelles Containing a Cytotoxic T-Cell Epitope Promote a Protective Immune Response In Vivo. *Adv Mater* 2012,24(28),3845-3849.

[0116] 9. Shimada, T.; Lee, S.; Bates, F. S.; Hotta, A.; Tirrell, M., Wormlike micelle formation in peptide-lipid conjugates driven by secondary structure transformation of the headgroups. *The journal of physical chemistry. B* 2009,113(42),13711-4.

[0117] 10. Trent, A.; Marullo, R.; Lin, B.; Black, M.; Tirrell, M., Structural properties of soluble peptide amphiphile micelles. *Soft Matter* 2011,7(20),9572-9582.

[0118] 11. Cui, H.; Webber, M. J.; Stupp, S. I., Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials. *Biopolymers* 2010,94(1),1-18.

[0119] 12. Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I., Self-assembly and mineralization of peptide amphiphile nanofibers. *Science* 2001,294(5547),1684-1688.

[0120] 13. Niece, K. L.; Hartgerink, J. D.; Donners, J. J.; Stupp, S. I., Self-assembly combining two bioactive peptide-amphiphile molecules into nanofibers by electrostatic attraction. *Journal of the American Chemical Society* 2003,125(24),7146-7147.

[0121] 14. Webber, M. J.; Tongers, J.; Renault, M. A.; Roncalli, J. G.; Losordo, D. W.;

Stupp,S.I.,Development of bioactive peptide amphiphiles for therapeutic cell delivery.*Acta Biomater* 2010,6(1),3-11.

[0122] 15.Cui,H.G.;Cheetham,A.G.;Pashuck,E.T.;Stupp,S.I.,Amino Acid Sequence in Constitutionally Isomeric Tetrapeptide Amphiphiles Dictates Architecture of One-Dimensional Nanostructures.*Journal of the American Chemical Society* 2014,136(35),12461-12468.

[0123] 16.Moyer,T.J.;Finbloom,J.A.;Chen,F.;Toft,D.J.;Cryns,V.L.;Stupp,S.I., pH and Amphiphilic Structure Direct Supramolecular Behavior in Biofunctional Assemblies.*Journal of the American Chemical Society* 2014,136(42),14746-14752.

[0124] 17.Webber,M.J.;Tongers,J.;Renault,M.-A.;Roncalli,J.G.;Losordo,D.W.;Stupp,S.I.,Reprint of:Development of bioactive peptide amphiphiles for therapeutic cell delivery.*Acta biomaterialia* 2015,23,S42-S51.

[0125] 18.Yu,Y.;Sleep,E.;Stupp,S.I.;Qin,G.J.,Novel Bioactive Peptide Amphiphiles Nanofibers for Enhancement of Human Cd34+ Cell Mediated Ischemic Tissue Repair.*Circulation* 2013,128(Suppl 22),A19043-A19043.

[0126] 19.Arslan,E.;Garip,I.C.;Gulseren,G.;Tekinay,A.B.;Guler,M.O.,Bioactive supramolecular peptide nanofibers for regenerative medicine.*Advanced healthcare materials* 2014,3(9),1357-1376.

[0127] 20.Kokkoli,E.;Mardilovich,A.;Wedekind,A.;Rexeisen,E.L.;Garg,A.;Craig,J.A.,Self-assembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles.*Soft Matter* 2006,2(12),1015.

[0128] 21.Rudra,J.S.;Sun,T.;Bird,K.C.;Daniels,M.D.;Gasiorowski,J.Z.;Chong,A.S.;Collier,J.H.,Modulating adaptive immune responses to peptide self-assemblies.*Acs Nano* 2012,6(2),1557-1564.

[0129] 22.Ecker,D.M.;Jones,S.D.;Levine,H.L.,The therapeutic monoclonal antibody market.*MAbs* 2015,7(1),9-14.

[0130] 23.Low,D.;O'Leary,R.;Pujar,N.S.,Future of antibody purification.*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007,848(1),48-63.

[0131] 24.Shukla,A.A.;Hubbard,B.;Tressel,T.;Guhan,S.;Low,D.,Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches.*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007,848(1),28-39.

[0132] 25.Deisenhofer,J.,Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution.*Biochemistry* 1981,20(9),2361-2370.

[0133] 26.Moks,T.;ABRAHMSSEN,L.;NILSSON,B.;Hellman,U.;SJOQUIST,J.;Uhlen,M.,Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains.*European Journal of Biochemistry* 1986,156(3),637-643.

[0134] 27.Braisted,A.C.;Wells,J.A.,Minimizing a binding domain from protein

A.Proceedings of the National Academy of Sciences 1996,93(12),5688-5692.

[0135] 28.Nilsson,B.;Moks,T.;Jansson,B.;Abrahmsén,L.;Elmblad,A.;Holmgren,E.;Henrichson,C.;Jones,T.A.;Uhlén,M.,A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A.Protein engineering 1987,1(2),107-113.

[0136] 29.Starovasnik,M.A.;Braisted,A.C.;Wells,J.A.,Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain.Proceedings of the National Academy of Sciences 1997,94(19),10080-10085.

[0137] 30.Olszewski,K.A.;Kolinski,A.;Skolnick,J.,Folding simulations and computer redesign of protein A three-helix bundle motifs.Proteins 1996,25.

[0138] 31.Boutelje,J.;Karlström,A.R.;Hartmanis,M.G.;Holmgren,E.;Sjögren,A.;Levine,R.L.,Human immunodeficiency viral protease is catalytically active as a fusion protein:characterization of the fusion and native enzymes produced in Escherichia coli.Archives of biochemistry and biophysics 1990,283(1),141-149.

[0139] 32.Hober,S.;Nord,K.;Linhult,M.,Protein A chromatography for antibody purification.J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007,848(1),40-7.

[0140] 33.Guatrecasas,P.,Protein purification by affinity chromatography.J.Biol.Chem 1970,245(12),3050.

[0141] 34.Huse,K.;Böhme,H.-J.;Scholz,G.H.,Purification of antibodies by affinity chromatography.Journal of biochemical and biophysical methods 2002,51(3),217-231.

[0142] 35.Hassouneh,W.;Christensen,T.;Chilkoti,A.,Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins.Curr Protoc Protein Sci 2010,Chapter 6,Unit 6 11.

[0143] 36.Sheth,R.D.;Jin,M.;Bhut,B.V.;Li,Z.;Chen,W.;Cramer,S.M.,Affinity precipitation of a monoclonal antibody from an industrial harvest feedstock using an ELP-Z stimuli responsive biopolymer.Biotechnol Bioeng 2014,111(8),1595-603.

[0144] 37.Handlogten,M.W.;Stefanick,J.F.;Alves,N.J.;Bilgicer,B.,Nonchromatographic affinity precipitation method for the purification of bivalently active pharmaceutical antibodies from biological fluids.Analytical chemistry 2013,85(10),5271-5278.

[0145] 38.Eisen,H.N.;Siskind,G.W.,Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response*.Biochemistry 1964,3(7),996-1008.

[0146] 39.Madan,B.;Chaudhary,G.;Cramer,S.M.;Chen,W.,ELP-z and ELP-zz capturing scaffolds for the purification of immunoglobulins by affinity precipitation.J Biotechnol 2013,163(1),10-6.

[0147] 40.Sheth,R.D.;Bhut,B.V.;Jin,M.;Li,Z.;Chen,W.;Cramer,S.M.,Development of an ELP-Z based mAb affinity precipitation process using scaled-down

filtration techniques. *J Biotechnol* 2014,192 Pt A,11-9.

[0148] 41. Kawashima, R.; Abei, M.; Fukuda, K.; Nakamura, K.; Murata, T.; Wakayama, M.; Seo, E.; Hasegawa, N.; Mizuguchi, H.; Obata, Y.; Hyodo, I.; Hamada, H.; Yokoyama, K.K., EpCAM-and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus. *Int J Cancer* 2011,129(5),1244-53.

[0149] 42. Kickhoefer, V.A.; Han, M.; Raval-Fernandes, S.; Poderycki, M.J.; Moniz, R.J.; Vaccari, D.; Silvestry, M.; Stewart, P.L.; Kelly, K.A.; Rome, L.H., Targeting vault nanoparticles to specific cell surface receptors. *ACS Nano* 2008,3(1),27-36.

[0150] 43. Freire, E.; Kawasaki, Y.; Velazquez-Campoy, A.; Schön, A., Characterisation of ligand binding by calorimetry. In *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets*, 2011; pp 275-299.

[0151] 44. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J.F.; Lin, L.-N., Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical biochemistry* 1989,179(1),131-137.

[0152] 45. Demers, J.-P.; Mittermaier, A., Binding mechanism of an SH3 domain studied by NMR and ITC. *Journal of the American Chemical Society* 2009,131(12), 4355-4367.

[0153] 46. van Eldijk, M.B.; Smits, F.C.; Thies, J.C.; Mecinovic, J.; van Hest, J.C., Thermodynamic investigation of Z33-antibody interaction leads to selective purification of human antibodies. *J Biotechnol* 2014,179,32-41.

[0154] 47. Lund, L.N.; Christensen, T.; Toone, E.; Houen, G.; Staby, A.; St Hilaire, P.M., Exploring variation in binding of Protein A and Protein G to immunoglobulin type G by isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit* 2011,24(6),945-52.

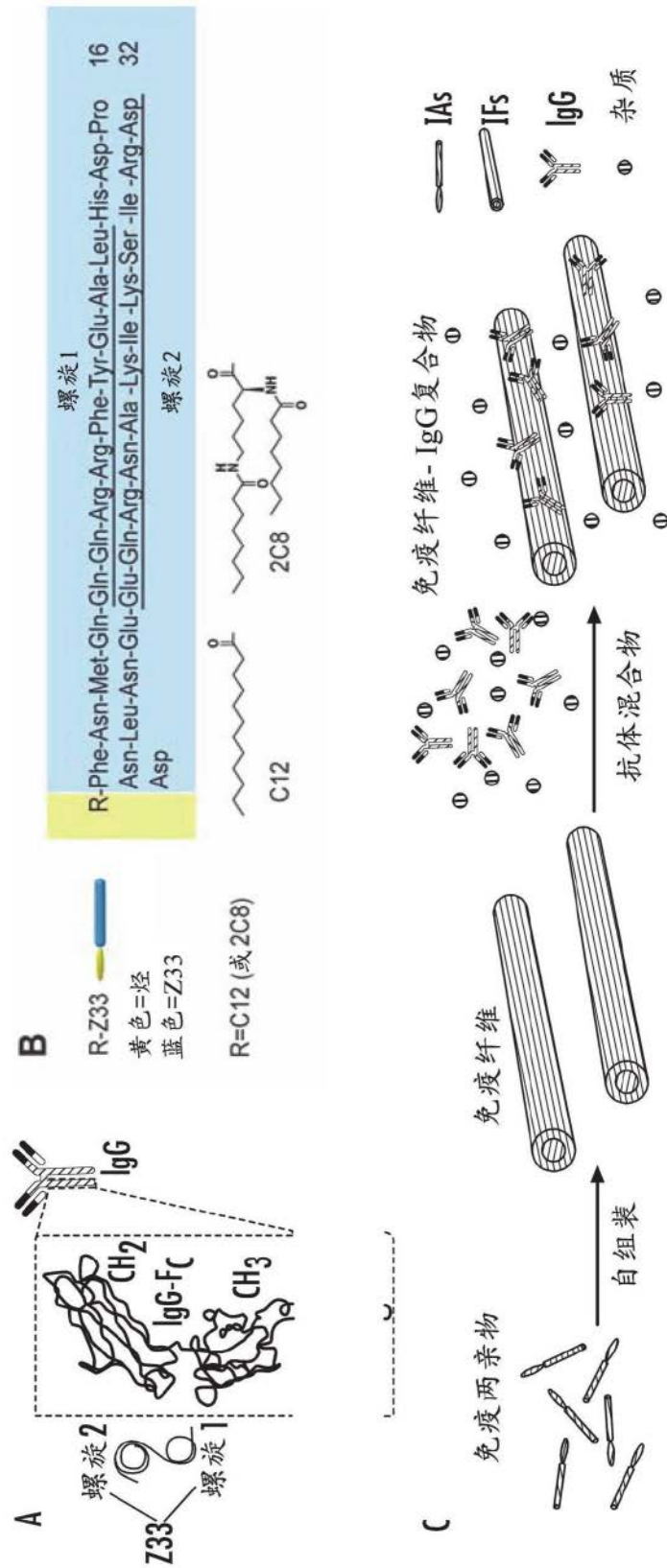


图1A-图1C

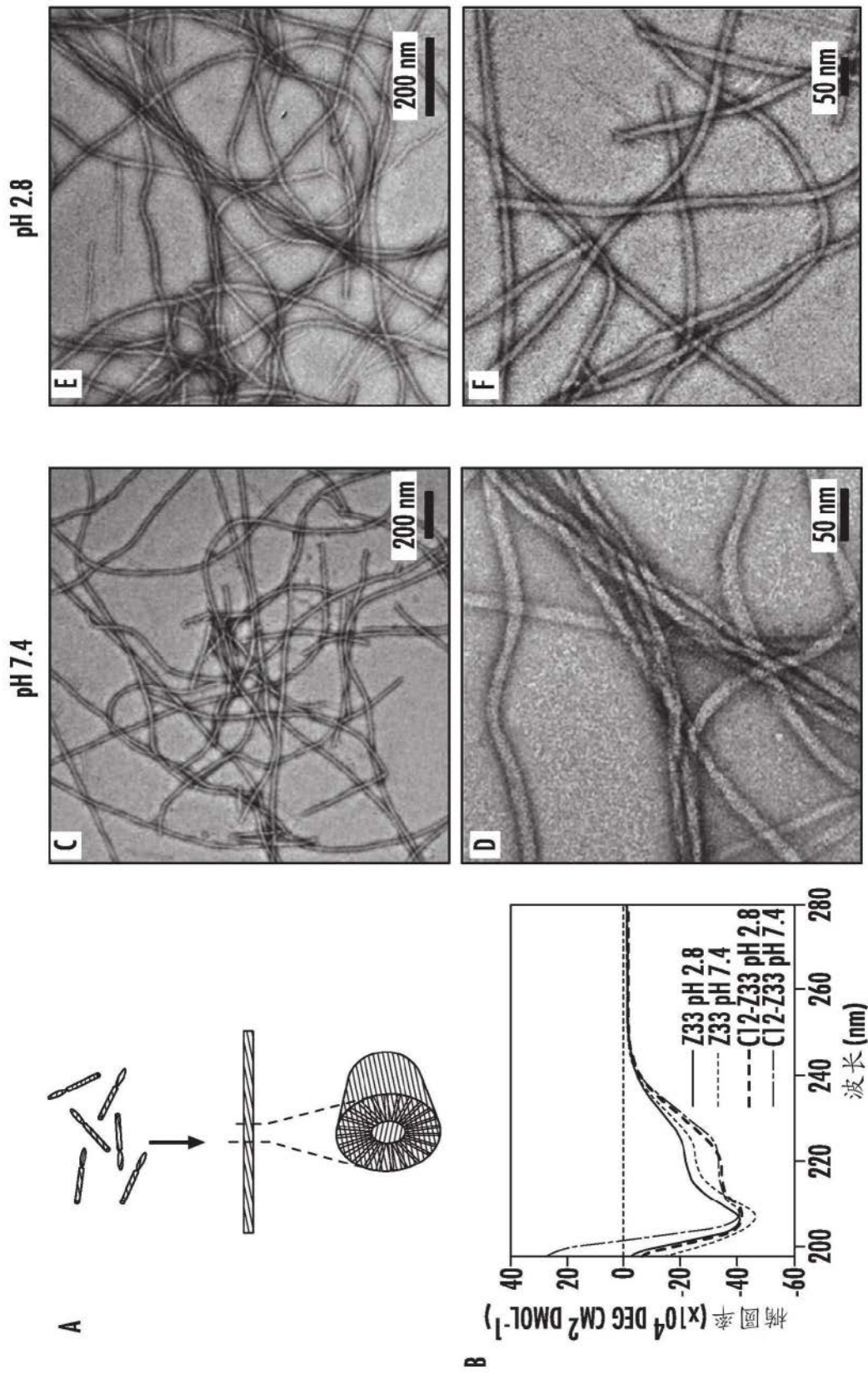


图2A-图2F

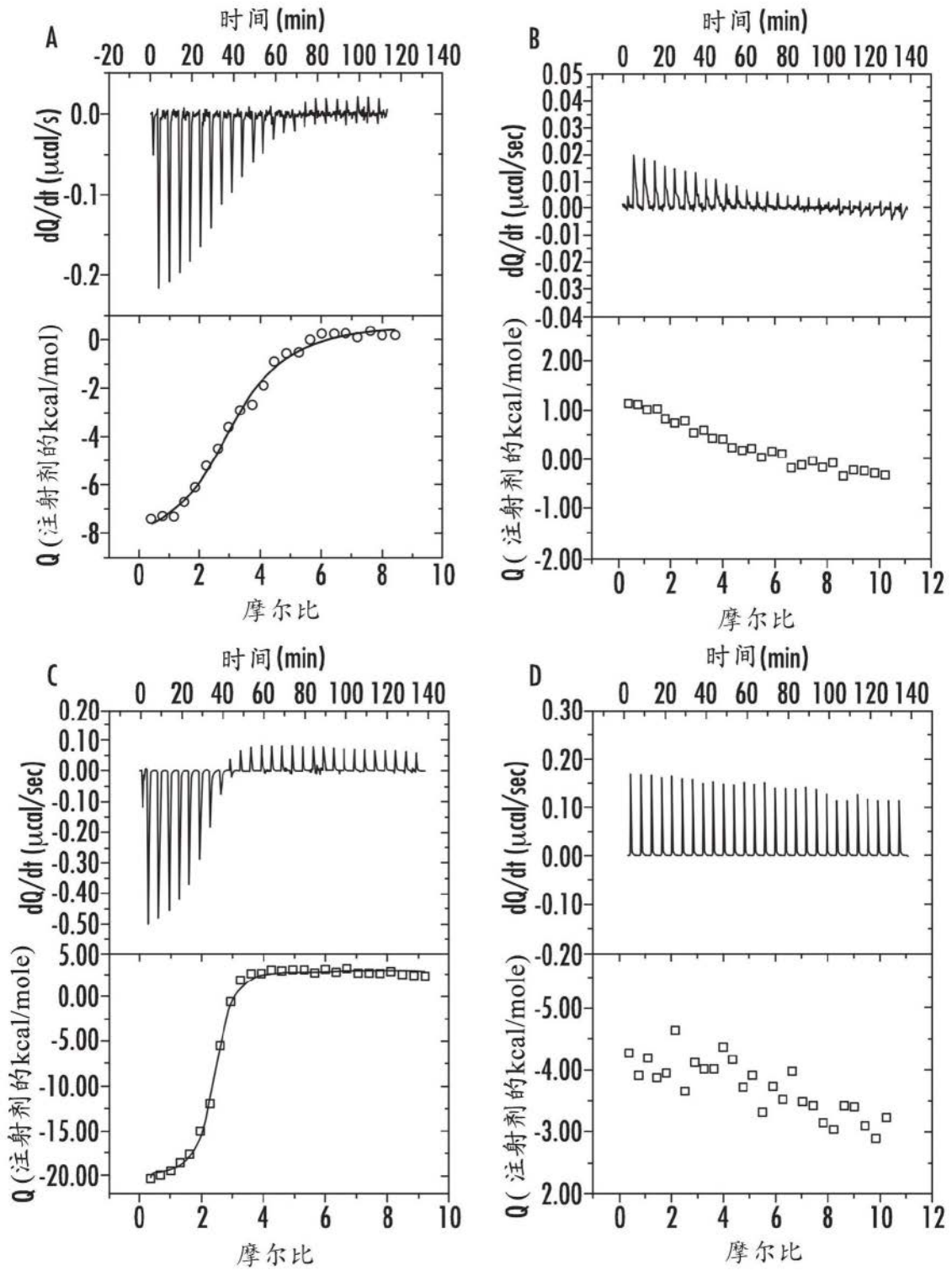


图3A-图3D

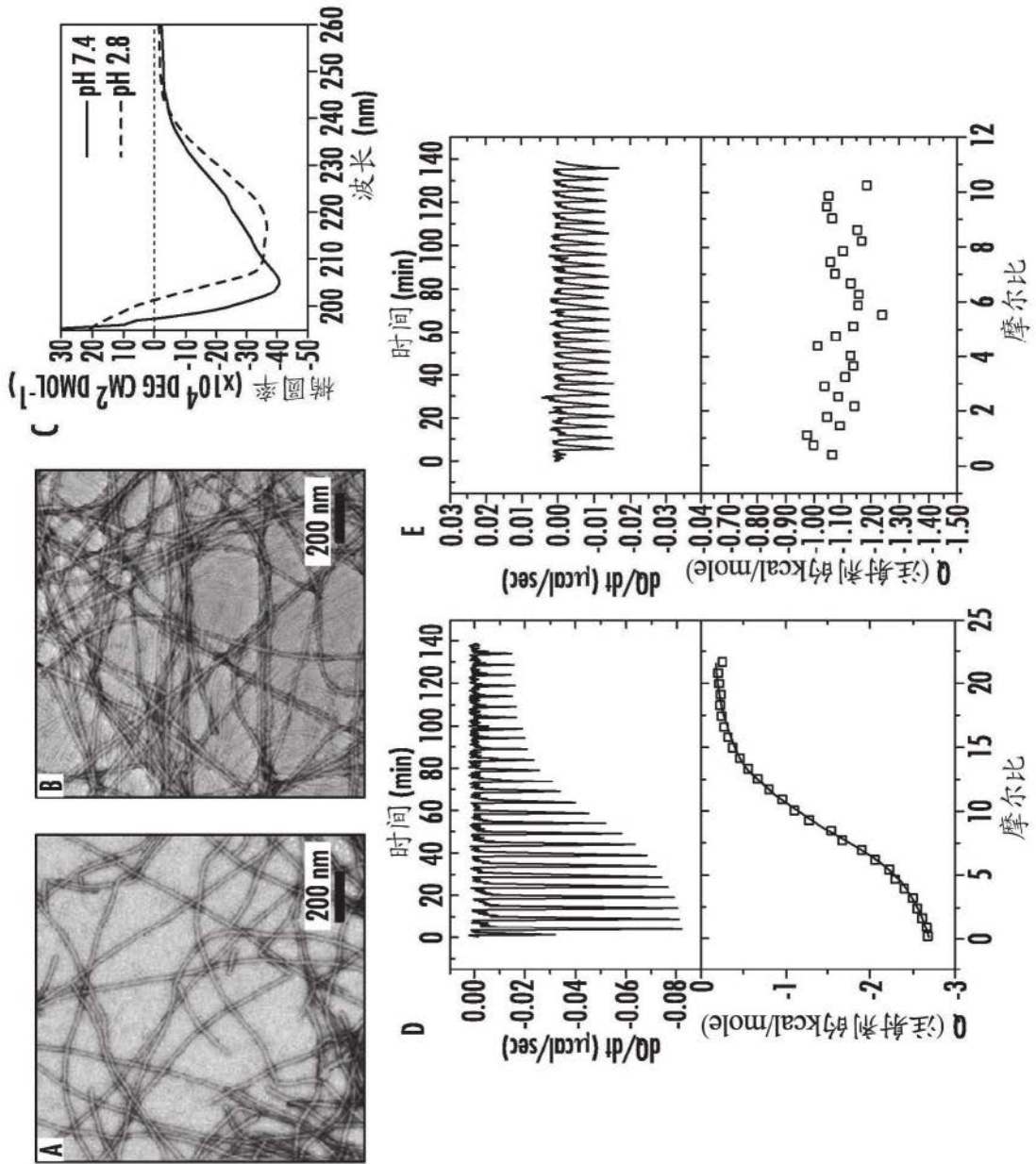


图4A-图4E

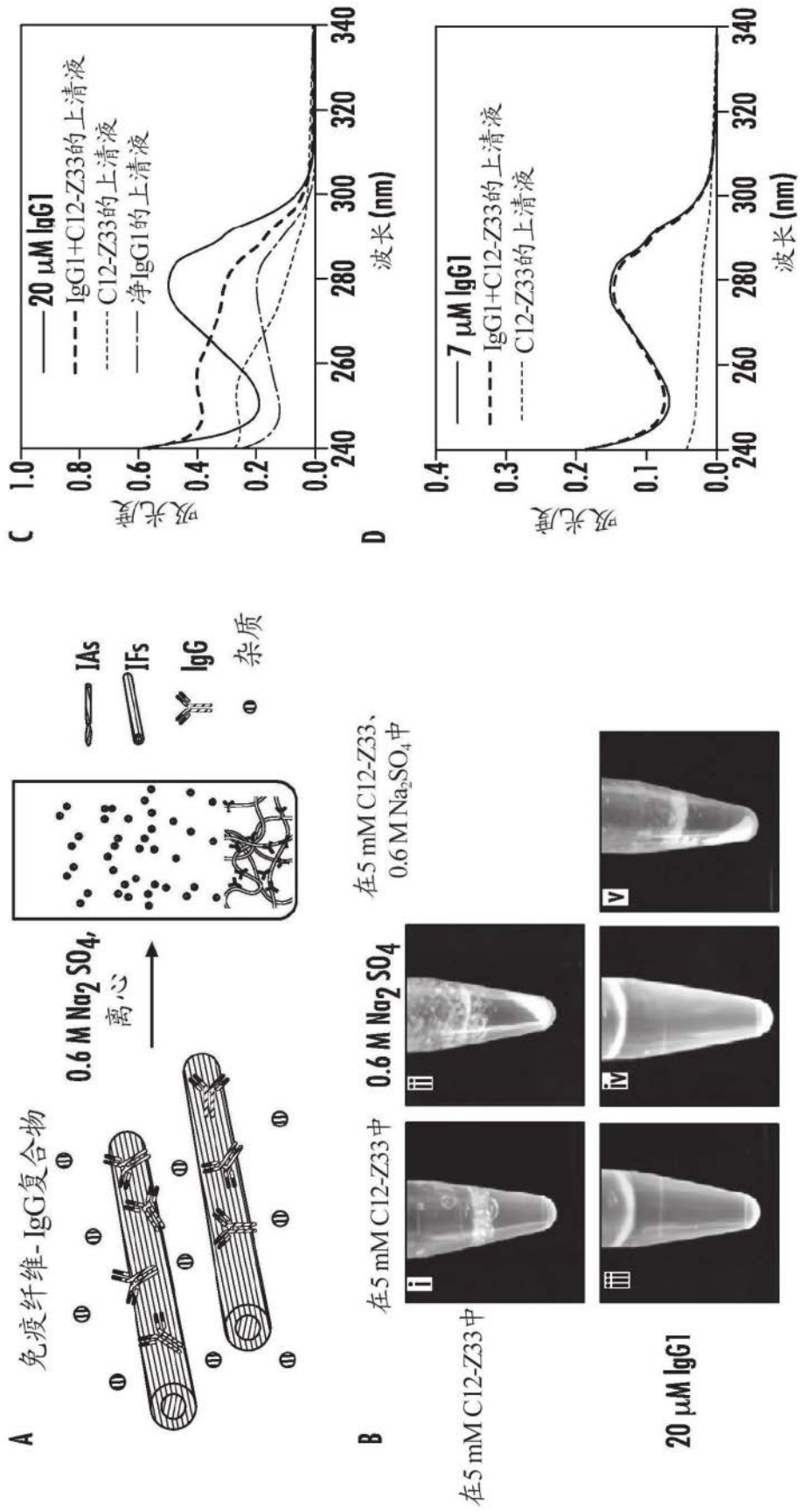


图5A-图5D

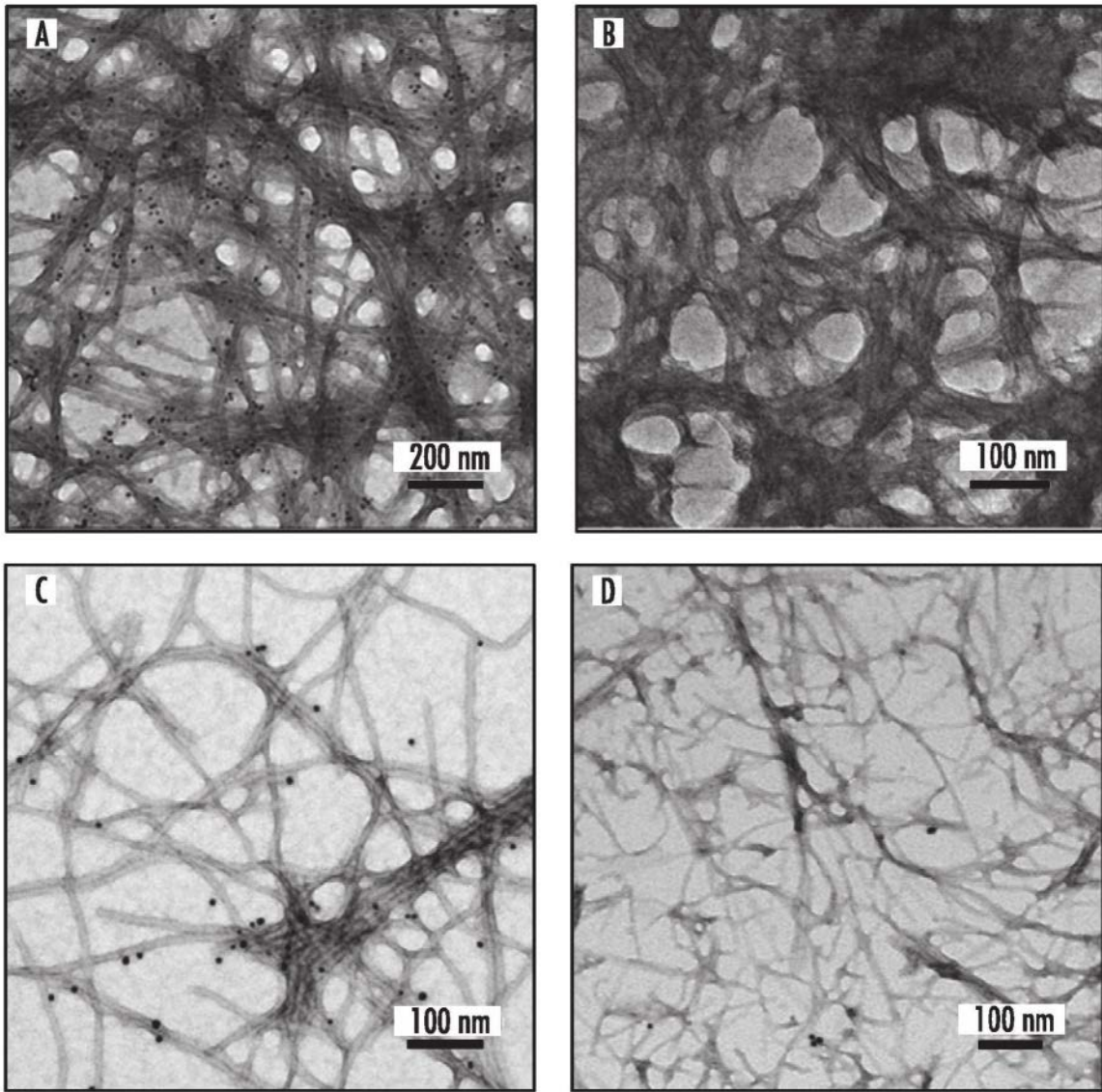


图6A-图6D

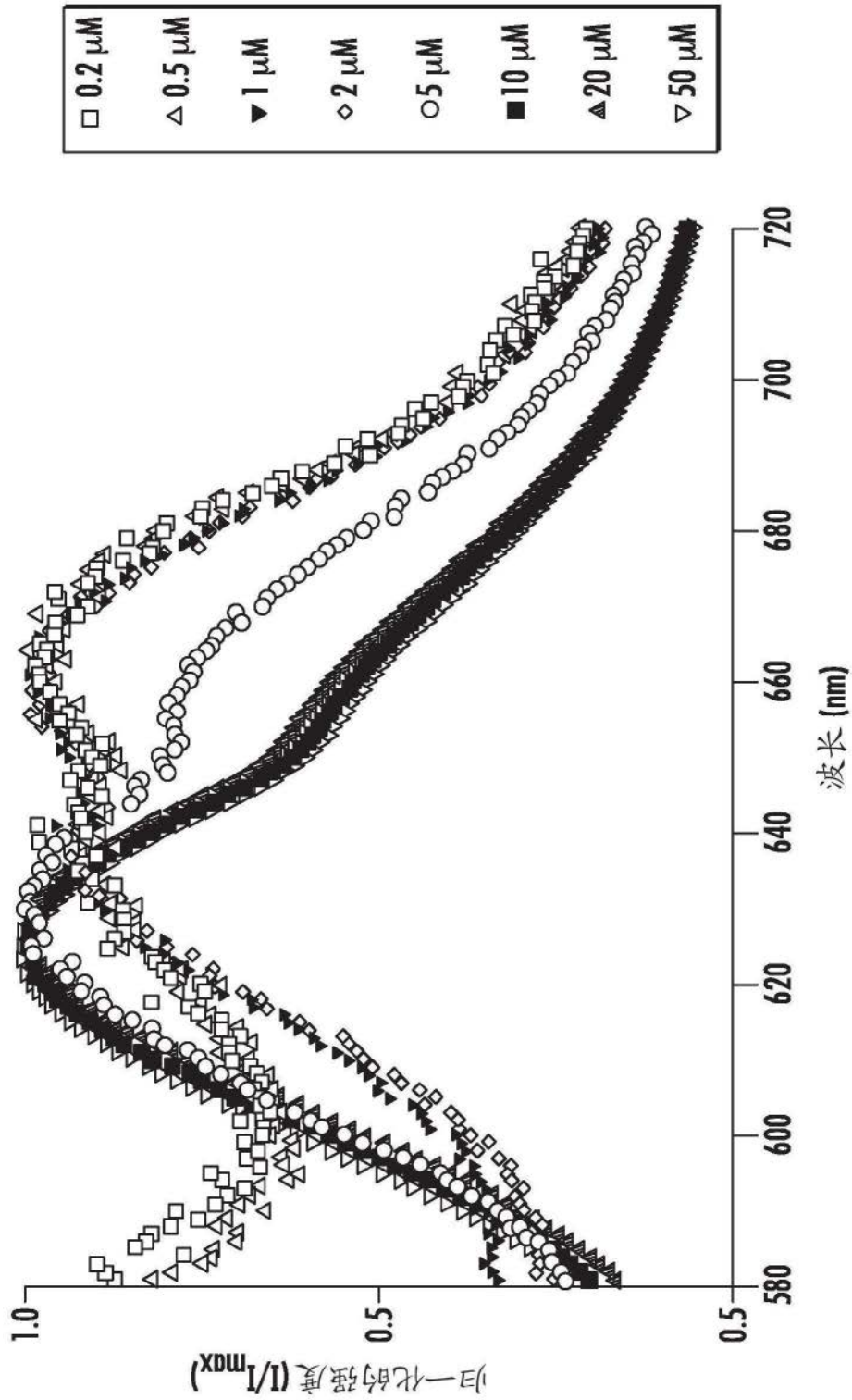


图7

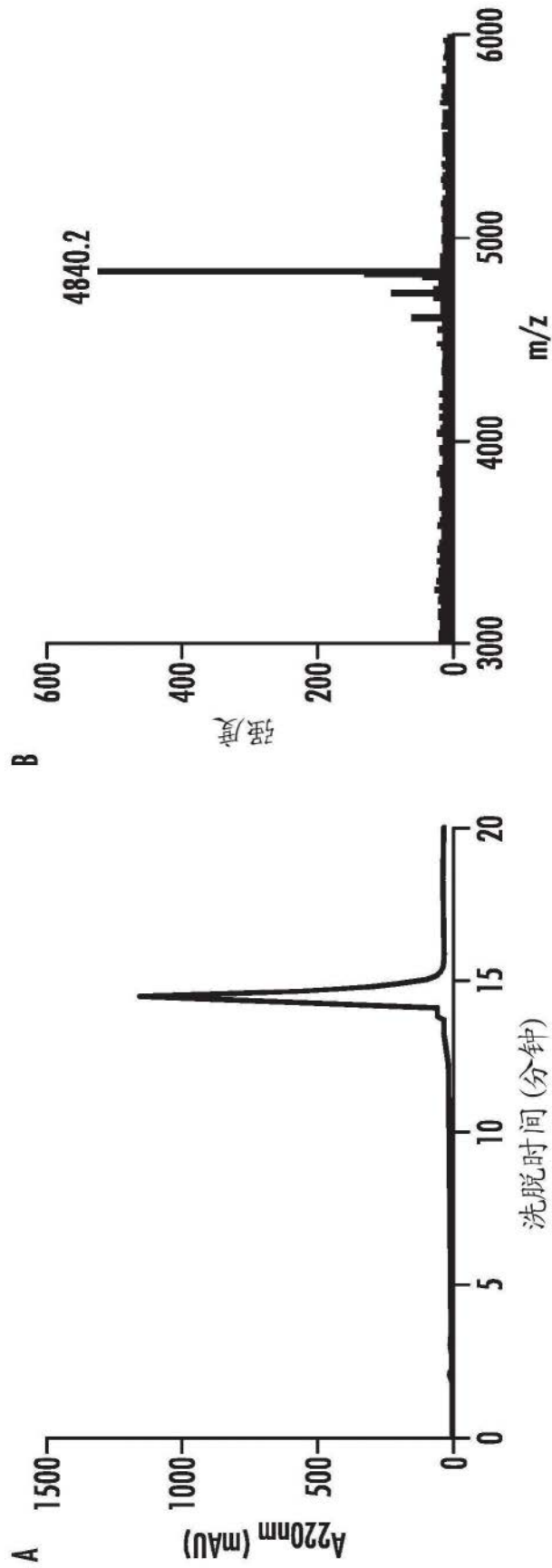


图8A-图8B

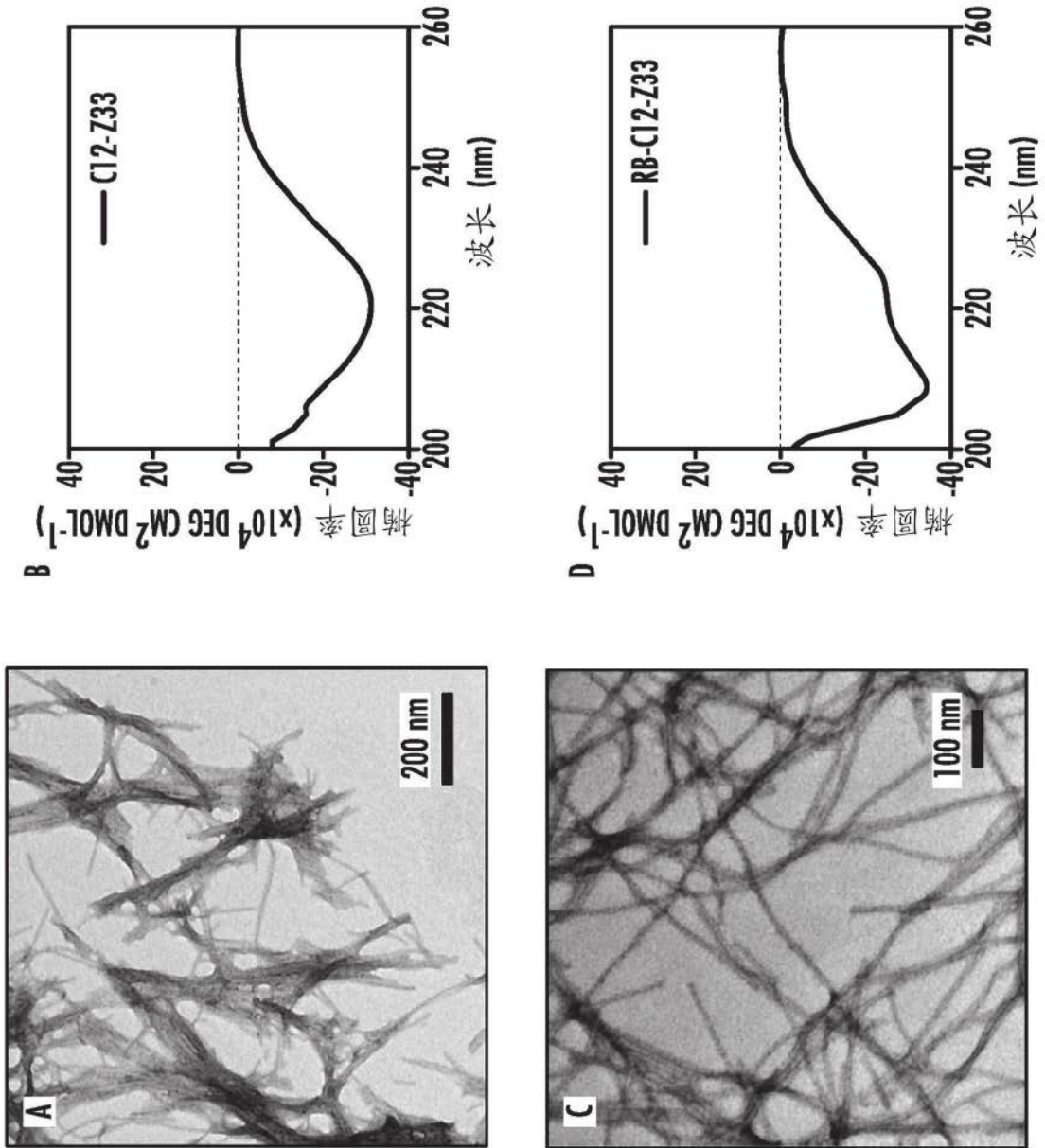


图9A-图9D

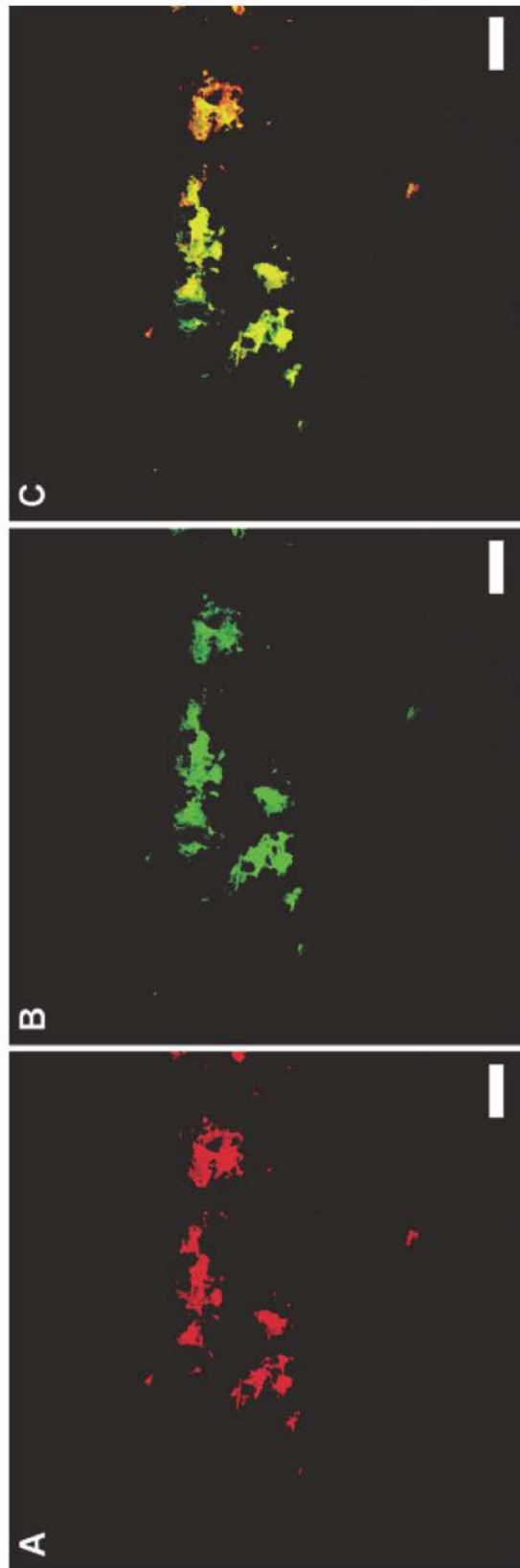


图10A-图10C