(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0148855
(43) 공개일자 2023년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/06 (2006.01) *B01D 15/38* (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) *C07K 1/30* (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/065 (2013.01)
B01D 15/3809 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7034773(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년03월28일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7031323
원출원일자(국제) 2018년03월28일
심사청구일자 2021년03월23일
(85) 번역문제출일자 2023년10월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/024721
(87) 국제공개번호 WO 2018/183417
국제공개일자 2018년10월04일
(30) 우선권주장
62/478,886 2017년03월30일 미국(US)

(71) 출원인
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400
브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
쿠이, 홍강
미국 21093 메릴랜드 루터빌 바츠 코트 10
리, 이
미국 21211 메릴랜드 볼티모어 비치 애비뉴 3925 아파트먼트 411
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

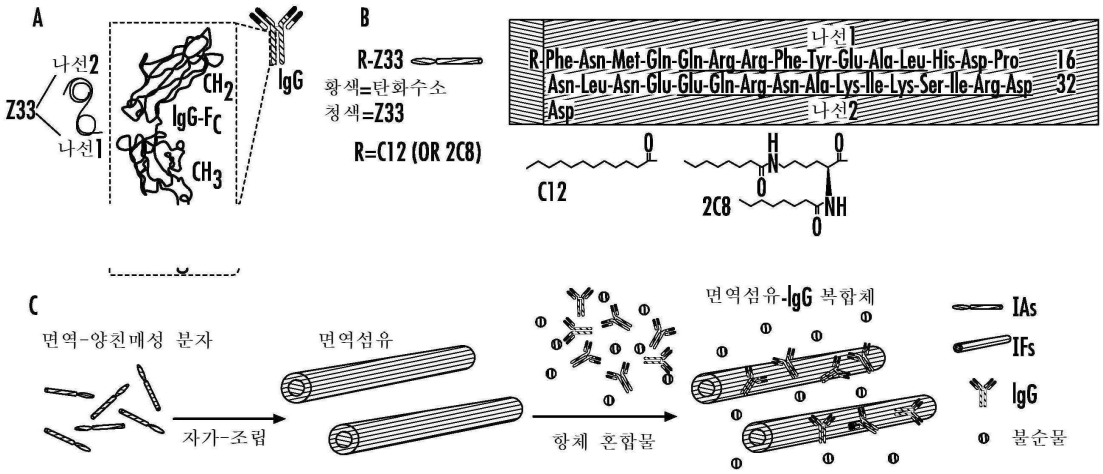
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **생체거대분자의 정제를 위한 초분자 고친화성 단백질-결합 시스템**

(57) 요 약

특정 구현예에서, 본 발명은 잠재적으로 간단하고 비용 효율적인 수단을 이용하는 신규한 항체 정제 방법 및 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 스태필로코커스 아우레우스 단백질 A로부터 유래된 맞춤화된 Z-33는 표면에 생물활성 에피토프를 갖는 수용액 중의 면역섬유로 조립될 수 있고, IgG 결합 능력을 가질 수 있는 면역-양친매성 분자를 작제하는데 사용된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 1/22 (2013.01)
C07K 1/30 (2013.01)
C07K 14/31 (2013.01)
(72) 발명자
쑤, 쑤언쿠오
미국 01719 매사추세츠 박스버러 콜로니얼 리지 드라이브 118
락, 라이 린
미국 01754 매사추세츠 메이너드 파인 스트리트 15 유닛 1디
리, 정지안
미국 01776 매사추세츠 서드베리 브루스터 로드 67

명 세 서

청구범위

청구항 1

선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자(immuno-amphiphile).

청구항 2

선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자로서, 상기 펩티드가 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α-나선 입체형태를 갖는, 면역-양친매성 분자.

청구항 3

선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자로서, 상기 항체 결합 펩티드가 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는, 면역-양친매성 분자.

청구항 4

선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자로서, 상기 항체 결합 펩티드가 아미노산 서열 FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1), 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는, 면역-양친매성 분자.

청구항 5

a) 생리학적 pH의 수용액에 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 면역-양친매성 분자를 용해시키고, 밤새 숙성시켜, 이를 면역섬유(IF)로 자가-조립시키는 단계;

b) 항체 또는 Fc 융합 단백질을 함유하는 샘플을 IF와 혼합하고, IF를 항체 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 부분에 결합시키고, 용액 중에 면역섬유-항체 복합체 또는 면역섬유-Fc 융합 단백질 복합체를 형성시키는 단계;

c) 염의 첨가 및 원심분리에 의해 용액으로부터 면역섬유-항체 복합체 또는 면역섬유-Fc 융합 단백질 복합체를 분리시키는 단계; 및

d) 항체 또는 Fc 융합 단백질로부터 IF를 해리시키고, 결합되지 않은 항체 또는 Fc 융합 단백질을 수집하는 단계를 포함하는,

항체 또는 Fc 융합 단백질의 정제를 위한 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, IF가 pH를 용리 조건으로 낮추고, 여과 또는 미세여과에 의해 항체 또는 Fc 융합 단백질로부터 분리되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 2017년 3월 30일에 출원된 국제 특허 출원 번호 62/478,886호의 이익을 주장하며, 이는 모든 목적상 본원에 완전히 기재되는 것처럼 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] 전자적으로 제출된 자료의 참조를 통한 결합

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 형식으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이의 전체내용은 참조로서 본원에 포함된다. 2018년 3월 20일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P14162-02_ST25.txt로 명명되며, 크기는 1,016 바이트이

다.

배 경 기 술

[0005] 합성 또는 천연 발생 펩티드 및 이의 유도체의 자가-조립에 의해 형성된 초분자 1차원(1D) 나노구조는 재생 의학, 약물 전달 및 질병 진단에서의 이들의 중요한 적용으로 인해 지난 30년에 걸쳐 급속히 관심을 받아 왔다.[1-10] 예를 들어, Stupp 연구소는 생리학적 조건하에서 초분자 나노섬유로 자가-조립될 수 있는 β-시트 형성 서열에 선형 탄화수소를 컨쥬게이션시켜 일련의 양친매성 펩티드(peptide amphiphile; PA)를 설계하고 합성하였다.[2,11-16] PA 조립에 생물학과 상호 작용하는 원하는 생물활성을 부여하기 위해, 다양한 생물활성 에피토프, 예를 들어, 세포 부착 모티프 RGD 및 신경돌기-촉진 서열 IKVAV(SEQ ID NO:2)가 분자 설계에 통합되었다.[13,17-20] 일 예에서, 웨버 등(Webber et al.)은 향상된 생물학적 부착을 의미하는 골수 단핵 세포(BMNC)의 표면 치료 전달에 RGDS(SEQ ID NO:3) 에피토프를 제시하는 생물활성 PA 나노섬유를 연구하였다.[14] 자가-조립 펩티드 모티프의 C- 또는 N-말단 상의 생물학적 펩티드의 상기 직접 배치는 특정 생체의학 적용을 위한 생물활성 재료를 생성시키는 인기 있는 전략이 되었다. 펩티드 조립의 면역원성을 조절하려는 노력으로, 콜리어(Collier)와 동료들은 항원 OVA 펩티드에 자가-조립 펩티드 Q11을 공유적으로 연결시켰고, 결과로서 발생된 초분자 OVA-Q11 나노섬유가 향상된 면역원성을 갖는 것을 발견하였다.[21]

[0006] 생물학적 치료제에 대한 모노클로날 항체의 수요가 증가함에 따라 약학 산업에서 고 친화성 항체-결합 입자 및 재료에 대한 관심이 급속하게 증가하고 있다.[22-24] 널리 공지된 항체-결합 리간드인 단백질 A는 인간을 포함하는 대부분의 포유동물 종으로부터의 IgG의 Fc-부분에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다.[25-26] 그러나, 단백질 A의 큰 크기는 이의 산업적 적용을 제한하고, 그에 따라 단백질 A의 다수의 합성 및 최소화된 도메인이 설계되고 연구되었다.[27-29] 단백질 A의 Z-도메인은 59개의 아미노산 잔기 및 IgG1에 결합하는 경우 약 10 nM의 K_d를 갖는 최초이자 가장 유명한 합성 도메인이다.[30-31] 단백질 A의 Z-도메인을 추가로 최소화하기 위해, 결합 친화성(K_d = 43 nM)을 유의하게 변화시키지 않으면서 2-나선 유도체 Z33이 설계되었다.[27] 고 친화성 리간드가 확인되었으나, 원하는 기질 상에 리간드를 제공하는 방법은 항체 정제 공정에 동등하게 필수적이다. 약학 산업에서, 항체 정제는 주로 높은 선택성을 가지나, 높은 크로마토그래피 매질 비용 및 제한된 포획 생산성을 겪는 항체 결합 리간드(예를 들어, 단백질 A)의 고정을 기초로 한 친화성 크로마토그래피에 의존한다.[32-34] 최근에서야 친화성 침전이 비교적 간단한 공정을 이용하여 효과적인 정제 및 잠재적으로 비병목현상(debottlenecking) 뱃치 처리량을 제공함으로써 전통적인 크로마토그래피 방법에 대한 매력적인 대안이 되었다.[35-38]

[0007] 친화성 침전의 전형적인 예는 ELP의 온도 및 염 유발 용해도 전이를 통해 IgG를 침전시키기 위한 엘라스틴-유사-단백질(ELP) 융합 Z-도메인의 사용이다.[39-40] 그러나, 박테리아에 의해 발현된 ELP의 높은 질량, 각각의 ELP 융합 리간드 상의 제한된 결합 부위, 및 상승된 온도에서의 항체의 잠재적 변성은 항체-결합 리간드를 제시하기 위해 새로운 기질을 찾는 관심을 촉진시킨다.

[0008] 자가-조립 양친매성 펩티드의 정밀한 분자 설계에 의해 영감을 받아, 본 발명자는 자가-조립 면역-양친매성 분자(immuno-amphiphile; IA)로 단백질 A 모방 펩티드 Z33을 통합시키는 방법을 연구하였고, 자가-조립 상태에서 표적 항체에 대한 이의 결합 능력을 조사하였다. 자가-조립 면역섬유(IF)와 치료 IgG 사이의 결합 친화성을 등온 적정 열량측정법(ITC)을 이용하여 조사하였고, 이는 IF를 함유하는 Z33이 이의 높은 IgG 결합 친화성을 유지함을 암시한다.

발명의 내용

[0009] 많은 1차원(1D) 나노구조가 생성된 조립의 방향성 비등방성 성장을 촉진하는 분자간 수소 결합에 필수적인 코어 빌딩 모티프로서 짧은 β-시트 서열을 함유하는 펩티드 또는 펩티드 컨쥬게이트의 자가-조립에 의해 작제된다. 이러한 분자 설계 전략은 세포와 상호작용하기 위한 과다의 생물활성 필라멘트성 β-시트 조립의 성공적인 생산을 가져왔으나, 아밀로이드 원섬유를 연상시키는 잠재적 독성과 관련된 우려가 α-나선 펩티드를 갖는 다른 초분자 제작 전략을 촉진시켰다.

[0010] 지금까지, 생물학적 활성 펩티드가 생물활성을 유지하면서 초분자 펩티드 나노구조로 성공적으로 통합될 수 있음을 입증한 다수의 연구가 문헌에 있다. 그러나, 에피토프가 α-나선 입체형태를 생물활성으로 유지해야 하는 경우, β-시트 형성 서열의 사용과 α-나선 모티프의 제시 사이에는 공간적인 비양립성 문제가 있는 것으로 보인다. 이와 관련하여, 본 발명자는 이제 모노클로날 항체에 대한 높은 결합 친화성을 갖는 2개의 자가-조립 면역-양친매성 분자를 생성시키기 위해 2개의 α-나선을 함유하는 모티프인 단백질 A 모방 펩티드 Z33의 선형 탄화수소로의 직접 컨쥬게이션을 제시하고, 이들 본 발명의 초분자 면역섬유(IF)가 모노클로날 항체 면역글로불린 G(IgG)의 침전 및 정제에 사용될 수 있음을 처음으로 입증한다.

[0011] 일부 구현예에 따르면, 본 발명은 자가-조립 면역-양친매성 분자를 생성시키기 위한 선형 탄화수소로의 2개의 α-나선을 함유하는 모티프인 아미노산 서열 FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1)을 갖는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 모방 펩티드 Z33의 단백질 A의 직접 컨쥬게이션을 포함한다. 결과는 결과로서 발생된 양친매성 펩티드가 필수적인 β-시트 세그먼트의 결핍에도 불구하고 이의 천연 α-나선 입체형태를 보존하면서 생리학적 조건하에서 초분자 면역섬유(IF)로 효과적으로 회합할 수 있음을 제시한다. 등온 적정 열량측정법 측정은 이들 자가-조립 면역섬유가 pH 7.4에서 높은 특이성으로 면역글로불린 G(IgG) 항체에 결합할 수 있으나, 용리 완충액, pH 2.8에서는 검출 가능한 결합이 발생하지 않음을 확인하였다.

[0012] 일부 추가 구현예에 따르면, 본 발명의 IF는 표적 IgG 항체의 침전 및 정제를 가능하게 하는 pH 의존적인 특이적 결합을 갖는 것으로 입증되었다.

[0013] 따라서, 일부 구현예에서, 섬유성 조립으로의 단백질 결합 펩티드의 초분자 공학은 효과적인 단백질 정제에 유용하다.

[0014] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공한다.

[0015] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 펩티드는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α-나선 입체형태를 취한다.

[0016] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.

[0017] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 아미노산 서열 FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1), 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.

[0018] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 a) 면역-양친매성 분자를 생리학적 pH의 수용액에 용해시키고, 밤새 숙성시켜 이를 면역섬유(IF)로 자가-조립시키는 단계; b) 항체 또는 Fc 융합 단백질을 함유하는 샘플을 IF와 혼합하고, IF를 항체 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 부분에 결합시키고, 용액 중에 면역섬유-항체 복합체 또는 면역섬유-Fc 융합 단백질 복합체를 형성시키는 단계; c) 염의 첨가 및 원심분리에 의해 용액으로부터 면역섬유-항체 복합체 또는 면역섬유-Fc 융합 단백질 복합체를 분리시키는 단계; 및 d) 항체 또는 Fc 융합 단백질로부터 IF를 해리시키고, 결합되지 않은 항체 또는 Fc 융합 단백질을 수집하는 단계를 포함하는, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 정제를 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, IF는 pH를 용리 조건으로 낮추고, 여과 또는 미세여과에 의해 항체 또는 Fc 융합 단백질로부터 분리될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1A-1C. (1A) IgG의 Fc-부분에 결합하는 Z33 펩티드의 개략도. (1B) C12-Z33 및 2C8-Z33의 서열. 알킬기 및 Z33은 각각 황색 및 청색 음영 영역으로 표시된다. Z33 펩티드에서 2개의 α-나선이 밑줄로 표시된다. (1C) R-Z33 IF의 자가-조립 및 IF와 IgG 사이의 결합의 개략도.

도 2A-2F. (A) C12-Z33의 자가-조립의 개략도. (B) pH 7.4 및 2.8에서 Z33 펩티드 및 Z33-C12 각각의 표준화된 CD 스펙트럼. pH 7.4(C, D) 및 2.8(E, F)에서의 C12-Z33의 TEM 특성규명. TEM 샘플은 PBS(pH 7.4) 및 IgG 용리 완충액(pH 2.8) 중 100 μM의 농도로 별도로 제조되었다. TEM 샘플은 2 wt% 우라닐 아세테이트로 음성 염색되었다.

도 3A-3D. (A) PBS 완충액, pH 7.4, 및 (B) IgG 용리 완충액, pH 2.8에서 15℃에서 2 μM IgG1의 용액으로의

100 μM C12-Z33의 적정을 위한 ITC 프로파일. 15℃, pH 7.4에서 PBS 중 2 μM IgG1으로의 100 μM (C) Z33 및 (D) C12-SZ33의 적정을 위한 ITC 프로파일.

도 4A-4E. (A) 16.8 ± 1.5 nm의 직경을 갖는 pH 7.4의 PBS 및 (B) 17.3 ± 1.9 nm의 직경을 갖는 pH 2.8의 IgG 용리 완충액에서의 2C8-Z33의 TEM 특성규명. TEM 샘플의 제조는 C12-Z33의 제조와 유사하였다. (C) pH 7.4의 PBS 중 100 μM 2C8-Z33의 표준화된 CD 스펙트럼은 α-나선 이차 구조를 나타내었다. (D) PBS 완충액, pH 7.4, 및 (E) IgG 용리 완충액, pH 2.8 중 2 μM IgG1의 용액으로의 100 μM 2C8-Z33의 적정을 위한 ITC 프로파일.

도 5A-5D. 0.6 M Na_2SO_4 용액에 의해 촉발된 IFs-IgG 복합체의 침전의 개략도. (B) 0.6 M Na_2SO_4의 첨가 전(i) 및 후(ii)의 C12-Z33의 5 mM PBS 용액 및 (iii) 5 mM C12-Z33, (iv) 0.6 M Na_2SO_4, 및 (v) 5 mM C12-Z33 및 0.6 M Na_2SO_4를 갖는 IgG1의 20 μM PBS 용액의 사진. 침전이 (ii) 및 (v)에서 관찰되었다. (C) 0.6 M Na_2SO_4의 첨가 전 및 후의 C12-Z33 및 IgG1+C12-Z33 복합체의 흡광도 스펙트럼. 순수한 IgG1의 상층액은 C12-Z33의 상층액에 의해 공제된 IgG1+C12-Z33의 상층액으로부터 유래된다. (D) 0.6 M Na_2SO_4의 첨가 전 및 후의 2 mM C12-SZ33 및 IgG1+C12-SZ33 복합체의 흡광도 스펙트럼.

도 6A-6D. PBS, pH 7.4에서 IgG-코팅된 Au 나노입자와의 인큐베이션 후의 (A, C) 100 μM C12-Z33 및 (B, D) 100 μM C12-SZ33의 TEM 이미지. IgG 농도: 0.33-0.66 μM.

도 7. C12-Z33의 CMC 측정. 일련의 농도의 C12-Z33과 함께 인큐베이션 후 Fluorolog 형광측정기(Jobin Yvon, Edison, NJ)에 의해 모니터링된 리포터 염료 Nile Red의 방출 스펙트럼. 여기 파장은 560 nm에서 고정되었고; 방출 스펙트럼은 580-720 nm로 모니터링되었다. C12-Z33의 CMC는 방출 최대의 청색-시프트에 의해 결정되며, 여기서 전이는 염료가 조립된 나노구조의 소수성 구획으로 분배되는 것을 나타낸다. 여기에 제시된 모든 스펙트럼은 방출 최대에 의해 표준화된다. C12-Z33에 대한 CMC 범위: 2-5 μM.

도 8A-B. RB-C12-Z33의 RP-HPLC(8A) 및 MALDI-TOF MS(8B) 특성규명. RP-HPLC 스펙트럼은 생성물의 순도를 확인한다(>99%). 예상 질량은 4838.5이다. 4840.2에서의 피크가 $[M+H]^+$에 해당한다.

도 9A-D. PBS, pH 7.4 중 100 μM (9A) C12-SZ33 및 (9C) RB-C12-Z33의 TEM 이미지. 둘 모두의 분자는 각각 11.5 ± 1.5 nm 및 13.8 ± 1.8 nm의 직경을 갖는 나노섬유로 자가-조립되었다. pH 7.4의 PBS 중 100 μM (9B) C12-SZ33 및 (9D) RB-C12-Z33 나노섬유의 표준화된 CD 스펙트럼은 각각 β-시트 및 α-나선 입체형태를 나타내었다.

도 10A-C. PBS(pH 7.4) 중 2 μM FITC-IgG와 함께 인큐베이션된 100 μM RB-C12-Z33의 공초점 형광 이미지는 로다민 B의 형광 신호와 FITC의 형광 신호의 공동-국소화를 나타낸다. (A) 로다민 B 형광의 이미지. (B) FITC 형광의 이미지 및 (C) (A) 및 (B)의 병합 이미지. 축척 막대: 20 μm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 스태필로코커스 단백질 A(SPA)는 스태필로코커스 아우레우스의 세포벽에서 원래 발견된 단백질이다. 이는 3개의 나선 다발로 폴딩되는 5개의 상동성 도메인으로 구성된다. 단백질 A는 인간을 포함하는 대부분의 포유동물 종으로부터의 면역글로불린 G(IgG로도 공지됨)의 Fc-부분에 대한 이의 특이적 결합으로 인해 면역학에서 중요한 역할을 한다. 단백질 A의 광범위한 구조적 및 생화학적 연구가 수행되었다. SPA를 인코딩하는 첫 번째 유전자는 1984년에 클로닝되고, 시퀀싱되고, 발현되었고, 이후 단백질 A를 기초로 한 다수의 합성 및 최소화된 IgG-결합 도메인이 후속되었다. 이들 중, Z-58 도메인이 친화성 크로마토그래피 및 친화성 침전에서 널리 사용되는 최초이자 가장 유명한 합성 도메인이다. 분자의 기능을 유의하게 변화시키지 않으면서 1996년에 또 다른 최소화 결합 도메인 Z-33이 획득되었다.

[0021] 여러 구현예에 따르면, 본 발명은 IF에 대한 빌딩 유닛으로 작용하는 면역-양친매성 분자로의 SPA의 항체 결합 도메인의 아미노산 서열의 변형 및/또는 유도체화를 위한 방법을 제공한다. IgG 항체 또는 이의 일부 또는 단편의 결합에 유용한 IF의 설계 및 생성의 예가 본원에 기재된다. 일단 면역섬유가 생리학적 pH 범위의 수용액에 형성되면, 표면 상에 제시된 노출된 생물활성 에피토프(결합 부위)는 IgG에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0022] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공한다.

[0023] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α-나선 입체형태를 갖는다.

[0024] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.

[0025] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 아미노산 서열 FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1), 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "면역-양친매성 분자"는 "면역섬유"로 명명된 불연속의 안정적인 초분자 나노구조로 자발적으로 회합할 수 있는 분자를 의미한다. 일반적으로, IF는 약 2.8 내지 약 7.5의 pH 범위에서 조립될 수 있다. 그러나, 결합 특성은 또한 pH 의존적이다. 더욱 양성으로 하전되는 이들 IF는 더 높은 pH의 용액과 회합하기 용이하며, 반대로 음성으로 하전된 IF는 더 낮은 pH의 용액에서 더 용이하게 회합할 것이다.

[0027] 일부 구현예에서, 친수성 펩티드는 8 내지 22개의 탄소를 갖는 탄화수소 꼬리에 컨쥬게이션되며, 선형이거나 분지형일 수 있다. 수용액에서의 용해도의 관점에서 탄수의 수에는 상한이 있다. 친수성 펩티드는 나노구조의 수용해도를 증가시키고, 바람직한 이차 구조 형성, 예를 들어, 베타 시트, 알파 나선, 폴리 프롤린 타입-II 나선, 베타 턴을 통해 원통형 또는 구형 마이셀, 중공 나노튜브, 토로이드, 디스크 및 소포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 잘 규정된 나노구조 구조의 형성을 촉진할 수 있다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어 "항체 결합 펩티드"는 약 10^{-6} M 내지 약 10^{-10} M의 K_d를 갖는 것과 같이 높은 친화성으로 항체, 또는 항체 분자의 특정 부분, 예를 들어, Fc 부분에 결합하는 능력을 갖는 펩티드를 의미한다.

[0029] 일부 구현예에서, 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z-도메인의 Z33 2-나선 유도체 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체이다.

[0030] 본원에서 사용되는 단백질 A의 Z33 펩티드는 FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열을 갖는다.

[0031] 용어 "아미노산"은 D 또는 L 형태의 천연 α-아미노산(예를 들어, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Lys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 및 Val) 뿐만 아니라 β-아미노산, 합성 및 비-천연 아미노산의 잔기를 포함한다. 많은 유형의 아미노산 잔기가 폴리펩티드에 유용하며, 본 발명은 천연의 유전학적으로 코딩된 아미노산으로 제한되지 않는다. 본원에 기재된 펩티드에서 사용될 수 있는 아미노산의 예는, 예를 들어, 문헌[Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc.] 및 그에 인용된 참고문헌에서 발견될 수 있다. 광범위한 아미노산 잔기의 또 다른 공급원은 RSP Amino Acids LLC의 웹사이트에 의해 제공된다.

[0032] "유도체"에 대한 본원에서의 언급은 본 발명의 항체 결합 펩티드의 부분, 단편 및 일부를 포함한다. 유도체는 또한 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가를 포함한다. 동족체는 동일 종의 뱀 또는 동일 속 또는 과의 뱀으로부터의 독으로부터의 기능적, 구조적 또는 입체화학적으로 유사한 펩티드를 포함한다. 모든 상기 동족체가 본 발명의 의해 고려된다.

[0033] 유사체 및 모방체는 비-천연 발생 아미노산을 함유하는 분자를 포함하거나, 아미노산을 함유하지 않지만 그럼에도 불구하고 펩티드와 기능적으로 동일하게 거동하는 분자를 포함한다. 천연 생성물 스크리닝은 유사체 및 모방체를 확인하기 위한 하나의 유용한 전략이다.

[0034] 펩티드 합성 동안 통합되는 비-천연 아미노산 및 유도체의 예는 노르류신, 4-아미노 부티르산, 4-아미노-3-하이드록시-5-페닐펜탄산, 6-아미노헥산산, t-부틸글리신, 노르발린, 페닐글리신, 오미틴, 사르코신, 4-아미노-3-하이드록시-6-메틸헵탄산, 2-티에닐 알라닌 및/또는 아미노산의 D-이성질체의 사용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 고려되는 공지된 비-천연 아미노산의 부분적 목록이 표 1에 제시된다.

[0035] 표 1: 비-천연 아미노산

비-전통적		비-전통적	
아미노산	코드	아미노산	코드
α-아미노부티르산	Abu	L-N-메틸알라닌	Nmala
α-아미노-a-메틸부티레이트	Mgabu	L-N-메틸아르기닌	Nmarg
아미노사이클로프로판-	Cpro	L-N-메틸아스파라긴	Nmasn
카르복실레이트		L-N-메틸아스파르트산	Nmasp
아미노이소부티르산	Aib	L-N-메틸시스테인	Nmcys
아미노노르보닐-	Norb	L-N-메틸글루타민	Nmgln
카르복실레이트		L-N-메틸글루탐산	Nmglu
사이클로헥실알라닌		Chexa L-N-메틸히스티딘	Nmhis
사이클로펜틸알라닌	Cpen	L-N-메틸이소류신	Nmile
D-알라닌	Dal	L-N-메틸류신	Nmleu
D-아르기닌	Darg	L-N-메틸리신	Nmlys
D-아스파르트산	Dasp	L-N-메틸메티오닌	Nmmet
D-시스테인	Dcys	L-N-메틸노르류신	Nmnle
D-글루타민	Dgln	L-N-메틸노르발린	Nmnva
D-글루탐산	Dglu	L-N-메틸오르니틴	Nmorn
D-히스티딘	Dhis	L-N-메틸페닐알라닌	Nmphe
D-이소류신	Dile	L-N-메틸프롤린	Nmpro
D-류신	Dleu	L-N-메틸세린	Nmser
D-리신	Dlys	L-N-메틸트레오닌	Nmthr
D-메티오닌	Dmet	L-N-메틸트립토판	Nmtrp
D-오르니틴	Dorn	L-N-메틸티로신	Nmtyr
D-페닐알라닌	Dphe	L-N-메틸발린	Nmval
D-프롤린	Dpro	L-N-메틸에틸글리신	Nmetg
D-세린	Dser	L-N-메틸-t-부틸글리신	Nmtbug

[0036]

[0037]

D-트레오닌	Dthr	L-노르류신	Nle
D-트립토판	Dtrp	L-노르발린	Nva
D-티로신	Dtyr	α-메틸-아미노이소부티레이트	Maib
D-발린	Dval	α-메틸-γ-아미노부티레이트	Mgabu
D-α-메틸알라닌	Dmala	α-메틸사이클로헥실알라닌	Mchexa
D-α-메틸아르기닌	Dmarg	α-메틸사이클로펜틸알라닌	Mcpen
D-α-메틸아스파라긴	Dmasn	α-메틸-α-나프틸알라닌	Manap
D-α-메틸아스파테이트	Dmasp	α-메틸페니실아민	Mpen
D-α-메틸시스테인	Dmcys	N-(4-아미노부틸)글리신	Nglu
D-α-메틸글루타민	Dmgln	N-(2-아미노에틸)글리신	Naeg
D-α-메틸히스티딘	Dmhis	N-(3-아미노프로필)글리신	Norn
D-α-메틸이소류신	Dmile	N-아미노-α-메틸부티레이트	Nmaabu
D-α-메틸류신	Dmleu	α-나프틸알라닌	Anap
D-α-메틸리신	Dmlys	N-벤질글리신	Nphe
D-α-메틸메티오닌	Dmmet	N-(2-카르바밀에틸)글리신	Ngln
D-α-메틸오르니틴	Dmorn	N-(카르바밀메틸)글리신	Nasn
D-α-메틸페닐알라닌	Dmphe	N-(2-카르복시에틸)글리신	Nglu
D-α-메틸프롤린	Dmpro	N-(카르복시메틸)글리신	Nasp
D-α-메틸세린	Dmser	N-사이클로부틸글리신	Ncbut
D-α-메틸트레오닌	Dmthr	N-사이클로헵틸글리신	Nchep
D-α-메틸트립토판	Dmtrp	N-사이클로헥실글리신	Nchex
D-α-메틸티로신	Dmty	N-사이클로데실글리신	Ncdec
D-α-메틸발린	Dmval	N-사이클로도데실글리신	Ncdod
D-N-메틸알라닌	Dnmala	N-사이클로옥틸글리신	Ncoct
D-N-메틸아르기닌	Dnmarg	N-사이클로프로필글리신	Ncpro
D-N-메틸아스파라긴	Dnmasn	N-사이클로운데실글리신	Ncund
D-N-메틸아스파테이트	Dnmasp	N-(2,2-디페닐에틸)글리신	Nbhm
D-N-메틸시스테인	Dnmcys	N-(3,3-디페닐프로필)글리신	Nbhe
D-N-메틸글루타민	Dnmgln	N-(3-구아니디노프로필)글리신	Narg

D-N-메틸글루타메이트	Dnmglu	N-(1-하이드록시에틸)글리신	Nthr
D-N-메틸히스티딘	Dnmhis	N-(하이드록시에틸)글리신	Nser
D-N-메틸이소류신	Dnmile	N-(이미다졸릴에틸)글리신	Nhis
D-N-메틸류신	Dnmleu	N-(3-인돌릴리에틸)글리신	Nhtrp
D-N-메틸리신	Dnmlys	N-메틸-γ-아미노부티레이트	Nmgabu
N-메틸사이클로헥실알라닌	Nmchexa	D-N-메틸메티오닌	Dnmmet
D-N-메틸오르니틴	Dnmorn	N-메틸사이클로펜틸알라닌	Nmcpen
N-메틸글리신	Nala	D-N-메틸페닐알라닌	Dnmphe
N-메틸아미노이소부티레이트	Nmaib	D-N-메틸프롤린	Dnmpro
N-(1-메틸프로필)글리신	Nile	D-N-메틸세린	Dnmser
N-(2-메틸프로필)글리신	Nleu	D-N-메틸트레오닌	Dnmthr
D-N-메틸트립토판	Dnmtrp	N-(1-메틸에틸)글리신	Nval
D-N-메틸티로신	Dnmtyr	N-메틸아-나프틸알라닌	Nmanap
D-N-메틸발린	Dnmval	N-메틸페니실아민	Nmpen
γ-아미노부티르산	Gabu	N-(p-하이드록시페닐)글리신	Nhtyr
L-t-부틸글리신	Tbug	N-(티오메틸)글리신	Ncys
L-에틸글리신	Etg	페니실아민	Pen
L-호모페닐알라닌	Hphe	L-α-메틸알라닌	Mala
L-α-메틸아르기닌	Marg	L-α-메틸아스파라긴	Masn
L-α-메틸아스파테이트	Masp	L-α-메틸-t-부틸글리신	Mtbug
L-α-메틸시스테인	Mcys	L-메틸에틸글리신	Metg
L-α-메틸글루타민	Mgln	L-α-메틸글루타메이트	Mglu
L-α-메틸히스티딘	Mhis	L-α-메틸호모페닐알라닌	Mhphe
L-α-메틸이소류신	Mile	N-(2-메틸티오에틸)글리신	Nmet
L-α-메틸류신	Mleu	L-α-메틸리신	Mlys
L-α-메틸메티오닌	Mmet	L-α-메틸노르류신	Mnle
L-α-메틸노르발린	Mnva	L-α-메틸오르니틴	Morn
L-α-메틸페닐알라닌	Mphe	L-α-메틸프롤린	Mpro
L-α-메틸세린	Mser	L-α-메틸트레오닌	Mthr

[0038]

L-α-메틸트립토판	Mtrp	L-α-메틸티로신	Mtyr
L-α-메틸발린	Mval	L-N-메틸호모페닐알라닌	Nmhphe
N-(N-(2,2-디페닐에틸)	Nnbhm	N-(N-(3,3-디페닐프로필)	Nnbhe
카르바밀메틸)글리신		카르바밀메틸)글리신	
1-카르복시-1-(2,2-디페닐-	Nmbc		
에틸아미노)사이클로프로판			

[0039]

[0040] 본원에서 고려되는 대상 펩티드의 유사체는 측쇄에 대한 변형, 펩티드 합성 동안의 비-천연 아미노산 및/또는 이의 유도체의 통합 및 펩티드 분자 또는 이의 유사체에 입체형태적 구속을 부과하는 가교제 및 다른 방법의 이용을 포함한다.

[0041] 본 발명의 의해 고려되는 측쇄 변형의 예는 알데하이드와의 반응에 의한 환원성 알킬화 후 $NaBH_4$를 이용한 환원; 메틸아세트이미데이트를 이용한 아미드화; 아세트산 무수물을 이용한 아실화; 시아네이트를 이용한 아미노기의 카르바모일화; 2,4,6-트리니트로벤젠 설폰산(TNBS)을 이용한 아미노기의 트리니트로벤질화; 숙신산 무수물 및 테트라하이드로프탈산 무수물을 이용한 아미노기의 아실화; 및 피리독살-5-포스페이트를 이용한 리신의 피리독

실화 후 $NaBH_4$를 이용한 환원과 같은 아미노기의 변형을 포함한다.

[0042] 아르기닌 잔기의 구아니딘 기는 2,3-부탄디온, 페닐글리옥살 및 글리옥살과 같은 시약을 이용한 헤테로사이클릭 축합 생성물의 형성에 의해 변형될 수 있다.

[0043] 카르복실기는 O-아실이소우레아 형성을 통한 카르보디이미드 활성화 후, 예를 들어, 상응하는 아미드로의 후속 유도체화에 의해 변형될 수 있다.

[0044] 설피드릴 기는 요오도아세트산 또는 요오도아세트아미드를 이용한 카르복시메틸화; 시스테인산으로의 과의산 산화; 다른 티올 화합물을 이용한 혼합 디설파이드의 형성; 말레이미드, 말레산 무수물 또는 다른 치환된 말레이미드와의 반응; 4-클로로머큐리벤조에이트, 4-클로로머큐리페닐설폰산, 페닐머큐리 클로라이드, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 및 다른 수은제를 이용한 수은제 유도체의 형성; 알칼리성 pH에서의 시아네이트를 이용한 카르바모일화와 같은 방법에 의해 변형될 수 있다.

[0045] 트립토판 잔기는, 예를 들어, N-브로모숙신이미드를 이용한 산화 또는 2-하이드록시-5-니트로벤질 브로마이드 또는 설페닐 할라이드를 이용한 인돌 고리의 알킬화에 의해 변형될 수 있다. 한편, 티로신 잔기는 테트라니트로메탄을 이용한 질화에 의해 변경되어 3-니트로티로신 유도체를 형성시킬 수 있다.

[0046] 히스티딘 잔기의 이미다졸 고리의 변형은 요오도아세트산 유도체를 이용한 알킬화 또는 디에틸피로카르보네이트를 이용한 N-카르브에톡실화에 의해 달성될 수 있다.

[0047] n=1 내지 n=6인 $(CH_2)_n$ 스페이서 기를 갖는 이기능성 이미도 에스테르, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르와 같은 동종-이기능성 가교제, 및 N-하이드록시숙신이미드와 같은 아미노-반응성 모이어티 및 또 다른 기 특이적-반응성 모이어티, 예를 들어, 말레이미도 또는 디티오 모이어티(SH) 또는 카르보디이미드(COOH)를 일반적으로 함유하는 이종-이기능성 시약을 이용하여, 예를 들어, 3D 입체형태를 안정화시키기 위해 가교제가 사용될 수 있다. 또한, 펩티드는, 예를 들어, C_α 및 N_α-메틸아미노산의 통합, 아미노산의 C_α와 C_β 원자 사이의 이중 결합의 도입 및 N과 C 말단 사이, 2개의 측쇄 사이 또는 측쇄와 N 또는 C 말단 사이에 아미드 결합을 형성시키는 것과 같은 공유 결합의 도입에 의한 사이클릭 펩티드 또는 유사체의 형성에 의해 입체형태적으로 구속될 수 있다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "펩티드"는 4 내지 100개의 아미노산 잔기 길이, 바람직하게는 약 10 내지 80개의 잔기 길이, 더욱 바람직하게는 15 내지 65개의 잔기 길이의 서열을 포함하며, 여기서 하나의 아미노산의 α-카르복실기는 인접한 아미노산의 주쇄(α- 또는 β-)아미노기에 대한 아미드 결합에 의해 연결된다.

[0049] 일부 다른 구현예에 따르면, 면역섬유는 몇몇 여과 방법, 예를 들어, 정용여과를 이용하여 결합된 항체로부터 분리될 수 있다.

[0050] 일부 구현예에 따르면, 일반적으로, 본 발명은 샘플의 항체 또는 Fc 융합 단백질과 생리학적 pH의 수용액 중의 본 발명의 면역섬유를 혼합하고, 면역섬유를 항체 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 부분에 결합시킴으로써 항체 또는 Fc 융합 단백질의 정제를 위한 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 면역섬유는 단백질 A의 Z33 부분을 포함하며, 항체의 Fc 부분에 특이적이다. 면역섬유가 결합하도록 하는 기간 후, 면역섬유는 용액에서 면역섬유-항체 또는 면역섬유-Fc 융합 단백질 복합체를 형성한다. 이후, 형성된 복합체는, 예를 들어, 염-유도 침전 및 원심분리를 포함하는 많은 공지된 분리 수단에 의해 샘플 내의 결합되지 않은 면역섬유 및 항체 또는 Fc 융합 단백질 및 다른 성분으로부터 분리될 수 있다. 이후, 분리된 복합체는 산성 pH에서 또 다른 용액으로 도입될 수 있으며, 여기서 면역섬유는 항체 또는 Fc 융합 단백질에 대한 이의 결합 친화성을 상실한다. 이후, 항체 또는 Fc 융합 단백질은 여과, 예를 들어, 정용여과 또는 다른 수단에 의해 해리된 면역섬유로부터 분리될 수 있고, 해리된 단량체도 또한 제거될 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 본 발명의 면역섬유를 이용하여 결합될 수 있는 관심 항체 또는 관심 Fc 융합 단백질을 함유하는 임의의 샘플 또는 용액 또는 유체 또는 혼합물을 의미한다. 일부 구현예에서, 샘플은 생물학적 샘플일 수 있다. 예를 들어, 샘플은, 예를 들어, 세포 배양물, 세포 용해물, 및 정화된 벌크(예를 들어, 정화된 세포 배양 상층액)를 포함한다. 선택적으로, 샘플은 관심 항체 또는 Fc 융합 단백질을 발현(천연적 또는 재조합적)하는 숙주 세포 또는 유기체로부터 생성된다. 예를 들어, 세포 배양물 내의 세포는 관심 항체 또는 Fc 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유하는 발현 작제물로 형질감염된 숙주 세포를 포함한다. 이들 숙주 세포는 박테리아 세포, 진균 세포, 곤충 세포, 또는 바람직하게는 배양물에서 성장된 동물 세포일 수 있다. 박테리아 숙주 세포는 E. 콜리 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 적합한 E. 콜리 균주의 예는 HB101, DH5α,

GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, 및 외래 DNA를 절단하지 못하는 임의의 E. 콜리 균주를 포함한다. 사용될 수 있는 진균 숙주 세포는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 아스퍼질루스(*Aspergillus*) 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 곤충 세포는 봄빅스 모리(*Bombyx mori*), 마메스트라 드라시카에(*Mamestra drassicae*), 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*), 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophilia melanogaster*)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다수의 포유동물 세포주는, 예를 들어, CHO, COS, PER.C6, TM4, VERO076, DXB11, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L cells, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, Jurkat 세포, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, 뮤린 골수종(예를 들어, SP2/0 및 NS0) 및 C2C12 세포, 뿐만 아니라 형질전환된 영장류 세포주, 하이브리도마, 정상 이배체 세포, 및 일차 조직 및 일차 체외이식편의 시험관 내 배양으로부터 유래된 세포 균주를 포함하는 적합한 숙주 세포이다.

[0052] 본 발명의 하나 이상의 구현예에 따르면, 용어 "생물학적 샘플" 또는 "생물학적 유체"는 살아 있거나 이전에 살아 있던 환자 또는 포유동물 또는 배양된 세포로부터의 임의의 양의 물질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 것이 이해될 것이다. 상기 물질은 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 세포, 기관, 조직, 뼈, 골수, 림프, 림프절, 활액 조직, 연골세포, 활액 대식세포, 내피 세포, 피부, 세포 배양물, 세포 용해질, 및 정화된 벌크(예를 들어, 정화된 세포 배양 상층액)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 본 발명의 특정한 특정 구현예에서, 본 발명을 이용하여 정제되는 단백질은 항체이다. 용어 "항체"는 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체를 포함함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이특이적 항체), 항체 단편, 면역부착소 및 항체-면역부착소 키메라를 포함하도록 가장 넓은 의미로 사용된다.

[0054] "항체 단편"은 항체의 적어도 Fc 부분 및 전형적으로 이의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다.

[0055] 용어 "모노클로날 항체"는 집단을 포함하는 개별 항체가 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하도록 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 획득된 항체를 나타내기 위해 통상적인 의미로 사용된다. 모노클로날 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 특이적이다. 이는 항원의 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 특이적인 다양한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제조물과 대조적인 반면, 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 특이적이다. 항체 기재에서의 용어 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 집단의 항체로부터 획득된 것으로서 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 모노클로날 항체는 문헌[Kohler et al., Nature 256:495 (1975)]에 처음 기재된 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여 생성될 수 있거나, 이들은 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567호 참조). 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어, 문헌[Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]; 및 미국 특허 번호 5,223,409호; 5,403,484호; 5,571,698호; 5,427,908호; 5,580,717호; 5,969,108호; 6,172,197호; 5,885,793호; 6,521,404호; 6,544,731호; 6,555,313호; 6,582,915호; 및 6,593,081호에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

[0056] 본원에 기재된 모노클로날 항체는 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 사슬(들)의 나머지가 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 및 "인간화" 항체 뿐만 아니라 상기 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 번호 4,816,567호; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). 비-인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래되는 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 과가변 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류로부터의 과가변 영역 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개선시키기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 루프가 비-인간 면역글로불린의 것에 해당하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역이 인간 면역글로불린 서열의 것인 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이다. 인간화된 항체는 선택적으로 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 추가의 상세한 설명은 문헌[Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596

(1992)]을 참조한다.

[0057] 본원에 기재된 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어, 인간 환자의 혈액으로부터를 포함하는 다양한 공급원으로부터 분리될 수 있거나, 트랜스제닉 동물을 이용하여 재조합적으로 제조될 수 있는 "인간" 항체를 포함한다. 상기 트랜스제닉 동물의 예는 인간 중쇄 트랜스진(transgene) 및 인간 경쇄 트랜스염색체(transchromosome)을 갖는 KM-MOUSE®(Medarex, Inc., Princeton, NJ)(WO 02/43478호 참조), XENOMOUSE®(Abgenix, Inc., Fremont CA; 예를 들어, Kucherlapati et al.의 미국 특허 번호 5,939,598호; 6,075,181호; 6,114,598호; 6,150,584호 및 6,162,963호에 기재됨), 및 HUMAB-MOUSE®(Medarex, Inc.; 예를 들어, 문헌[Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; 및 Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851], 미국 특허 번호 5,545,806호; 5,569,825호; 5,625,126호; 5,633,425호; 5,789,650호; 5,877,397호; 5,661,016호; 5,814,318호; 5,874,299호; 및 5,770,429호; 5,545,807호; 및 PCT 공개 번호 WO 92/03918호, WO 93/12227호, WO 94/25585호, WO 97/13852호, WO 98/24884호 및 WO 99/45962호, WO 01/14424호(Korman et al.)에 기재됨)을 포함한다. 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 면역화시 인간 항체 반응이 발생될 수 있도록 인간 면역 세포가 재구성된 SCID 마우스를 이용하여 제조될 수 있다. 상기 마우스는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,476,996호 및 5,698,767호(Wilson et al.)에 기재되어 있다.

[0058] *실시예*

[0059] 재료. 모든 Fmoc 아미노산 및 수지를 Advanced Automated Peptide Protein Technologies(AAPPTEC, Louisville, KY, UXSA)에서 구입하였고, Fmoc-Lys(Fmoc)를 Novabiochem(San Diego, CA, USA)에서 입수하였다. 치료용 인간 IgG1(IgG1)은 Bristol-Myers Squibb(Boston, MA, USA)에서 입수하였고, IgG 용리 완충액은 Thermo Fisher Scientific(Rockford, IL, USA)으로부터 공급받았다. 모든 다른 시약은 VWR(Radnor, PA, USA)에서 입수하였고, 추가 정제 없이 수령한 그대로 사용하였다.

[0060] 분자 합성. C12-Z33 및 2C8-Z33 면역-양친매성 분자를 유사한 방법을 이용하여 합성하였다. 간단히, Z33 펩티드를 먼저 표준 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc) 고상 합성 프로토콜을 이용하여 Focus XC 자동 펩티드 합성기(AAPPTEC, Louisville, KY)에서 합성하였다. 이후, C12(또는 2C8) 알킬 사슬을 Z33 펩티드의 N-말단(Fmoc 제거 후)에서 실온에서 밤새 진탕하면서 Z33 펩티드에 비해 4(또는 8):4:6의 비의 라우르산(또는 옥탄산)/HBTU/DIEA과 함께 수동으로 커플링시켰다. Fmoc 탈보호를 10분 동안 DMF 용액 중 20% 4-메틸피페리딘을 이용하여 수행하였고, 1회 반복하였다. 모든 경우에, 반응은 유리 아민에 대해 닌히드린 시험(Anaspec Inc., Fremont, CA)에 의해 모니터링되었다. 완성된 펩티드를 2.5시간 동안 92.5:5:2.5의 비의 TFA/TIS/H_2O의 혼합물을 이용하여 고체 지지체로부터 절단하였다. 과량의 TFA를 회전 증발에 의해 제거하고, 저온 디에틸 에테르를 첨가하여 미정제 펩티드를 침전시켰다. 원심분리 방법에 의해, 침전된 펩티드 및 디에틸 에테르를 3분 동안 6000 rpm에서 분리시켰다. 펩티드를 디에틸 에테르로 2회 더 세척하고, 용액을 원심분리에 의해 제거하였다.

[0061] IA를 분획 수집기가 장착된 Varian ProStar Model 325 분취용 HPLC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에서 25℃에서 Varian Polymeric Column(PLRP-S, 100 Å, 10 μm, 150 X 25 mm)을 이용한 분취용 RP-HPLC에 의해 정제하였다. 0.1% v/v TFA를 함유하는 물/아세토니트릴 구배를 20 ml/min의 유량으로 용리액으로 사용하였다. 흡광도 피크를 Z33 펩티드 세그먼트에 대해 220 nm에서 모니터링하였다. 미정제 물질을 20 ml의 0.1% 수성 TFA에 용해시키고, 각각의 정제 작업을 10 ml 주입으로 수행하였다. 수집된 분획을 MALDI-ToF(BrukerAutoflex III MALDI-ToF 기기, Billerica, MA)로 분석하고, 원하는 생성물을 함유하는 것을 동결건조(FreeZone -105℃ 4.5 L 동결 건조기, Labconco, Kansas City, MO)시키고, -30℃에서 저장하였다.

[0062] 면역-양친매성 분자의 자가-조립 및 TEM 영상화. 1 mM 농도를 갖는 면역-양친매성 분자를 HFIP로 전처리한 후, 1XPBS 또는 탈이온수에 용해시키고, 실온에서 밤새 숙성시켰다; 10 μl의 10배 희석된 샘플을 400 정사각형 메쉬(EMS: Electron Microscopy Sciences)를 갖는 탄소 필름 구리 격자 상에 스포팅하고, 과량을 여과지로 제거하여 격자 상에 샘플의 박층을 남겼다. 샘플을 5분 동안 건조시킨 후, 10 μl의 2% 우라닐 아세테이트를 샘플 격자에 첨가하고, 과량을 30초 후에 제거하였다. 모든 샘플을 TEM 영상화 전에 적어도 3시간 동안 건조시켰다.

[0063] 원형 이색성 분광법(CD). 둘 모두의 자가-조립된 샘플의 CD 실험을 25℃에서 1 mm 경로 길이의 석영 UV-Vis 흡수 셀(ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 Jasco J-710 분광평광계(JASCO, Easton,

MD, USA)에서 수행하였다. 샘플을 실험 전에 1 mM 스톡 용액으로부터 1XPBS 중 100 μM로 즉시 희석시켰다. 스펙트럼을 3개 스캔의 평균으로 190-280 nm의 파장 범위에서 수집하였다. 용매의 배경 스펙트럼을 획득하고, 샘플 스펙트럼에서 공제하였다. 수집된 데이터를 샘플 농도와 관련하여 표준화시켰다.

[0064] ITC 실험. 등온 적정 열량측정법 실험을 고정밀 VP-ITC 적정 열량측정 시스템(Microcal Inc.)을 이용하여 수행하였다. IgG1 용액을 15℃에서 1XPBS(pH 7.4 또는 2.8)에서 면역-양친매성 분자로 적정하였다. IgG1 농도를 0.1%(1 mg/ml) IgG 용액에 대해 280 nm에서 1.4의 질량 소멸 계수를 이용하여 계산하였다. 면역-양친매성 분자의 농도를 전체 질소 검정에 의해 결정하였다(*Anal. Biochem.*, 61.2 (1974): 623-627). 각각의 주입 후 방출된 열이 열량측정 신호의 적분으로부터 획득되었다. IgG1에 대한 면역-양친매성 분자의 결합과 관련된 열은 희석액의 열을 공제함으로써 획득되었다. 데이터 분석을 MicroCal OriginTM 패키지를 이용하여 수행하였다.

[0065] 실시예 1

[0066] 전장 Z33 면역-양친매성 분자의 분자 설계. 이러한 양친매성 펩티드 컨쥬게이트, 예를 들어, 양친매성 펩티드, 펩티드-중합체 컨쥬게이트, 펩티드-약물 컨쥬게이트 등의 작제는 다양한 초분자 나노구조를 생성시키는데 널리 사용되어 왔다. 친수성 Z33 펩티드 서열(FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD)(SEQ ID NO: 1) 및 소수성 알킬 사슬로 구성된 IgG 결합 면역-양친매성 분자는 면역섬유(IF)에 대한 빌딩 모티프로 작용하도록 설계되었다. Z33 펩티드는 높은 결합 친화성(Kd=43 nM)을 갖는 IgG의 Fc 부분에 특이적으로 결합하는 단백질 A(도 1A)로부터의 2-나선 유도체이다.[28,41-42]

[0067] 2개의 IA, C12-Z33 및 2C8-Z33(도 1B)을 라우르산 모이어티(C12) 또는 2개의 옥탄산 모이어티(2C8)를 Z33 펩티드의 N-말단에 직접 컨쥬게이션시킴으로써 합성하였다. 도 1C에 제시된 바와 같이, IA는 IF로 자가 조립되고, 항체 혼합물 용액으로부터의 IgG에 특이적으로 결합하는 것으로 예상되었다. 순수한 Z33 펩티드를 또한 Z33 분자와 IF를 함유하는 Z33 사이의 생물활성을 비교하기 위해 합성하였다. 또 다른 대조군 분자 C12-SZ33은 스크램블링된 서열로 Z33의 N-말단에 C12를 컨쥬게이션시킴으로써 설계되었다. 모든 분자는 자동 고상 펩티드 합성(SPPS) 방법 및 RP-HPLC를 이용하여 합성되고, 정제되었다. 합성된 화합물의 순도 및 예상 분자 질량을 분석 HPLC 및 질량분광법을 이용하여 확인하였다.

[0068] 실시예 2

[0069] 전장 Z33 면역-양친매성 분자 구현예의 분자 자가-조립 및 특성규명. 2개의 IA의 자가-조립은 2-단계 작업을 통해 용이하게 달성될 수 있다. 첫째로, IA를 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)에서 개별적으로 전처리하여 자가-조립된 형태의 용해도 및 균일성에 영향을 줄 수 있는 임의의 기존의 나노구조를 제거하였다. 둘째로, HFIP를 증발을 통해 제거한 후, 탈이온수 또는 포스페이트-완충 염수(PBS)를 첨가하여 1 mM의 최종 농도에 도달시켰다. 소수성 상호작용에 의해 IF의 코어에 포획된 알킬 세그먼트 및 용매를 향한 쉘 내에 제시된 생물활성 Z33 서열로 IF가 형성되었다(도 2A). 실온에서 밤새 숙성 후, 투과 전자 현미경(TEM) 및 원평광 이색성(CD)을 이용하여 조립된 나노구조의 형태를 특성규명하였다.

[0070] 본 발명의 IgG 정제 방법에서 pH 조건의 중요한 역할을 고려하여, pH 변화에 대한 C12-Z33의 자가-조립 거동을 평가하였다. 일반적으로, 중성 pH가 결합 조건으로 일반적으로 사용되는 반면, 산성 pH는 단백질 A 친화성 컬럼으로부터 항체를 용리시키는데 사용된다.[32,34] 중성 및 낮은 pH에서 자가-조립 거동을 연구하기 위해, PBS(pH 7.4) 및 IgG 용리 완충액(pH 2.8)을 C12-Z33의 자가-조립에 대한 수성 환경으로 사용하였다. 상이한 pH에서 C12-Z33 IF의 형태를 TEM(도 2C 내지 2F) 및 CD(도 2B)에 의해 연구하였다. C12-Z33 분자가 상기 언급된 둘 모두의 pH 조건에서 잘 용해될 수 있고, 나노섬유로 자가-조립될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 100 μM C12-Z33의 용액으로부터의 대표적인 TEM 이미지는 C12-Z33가 생리학적 조건 및 산성 조건 둘 모두에서 완전히 연장된 펩티드 분자의 길이(β-시트 입체형태에서 약 22.5 nm) 미만의 값인 16.0 ± 1.7 nm의 직경을 갖는 나노섬유 구조로 자가-조립되는 것을 나타내었다. 나노섬유의 길이는 마이크로미터 규모로 제시되었으며, 잘 제어될 수 없었다. 자가-조립된 구조 내의 분자 패킹을 추가로 이해하기 위해, 원평광 이색성(CD)을 사용하여 펩티드 이차 구조를 연구하였다. 약 222 nm(n-π*) 및 208 nm(π-π*)에서의 강한 음성 신호가 C12-Z33에서 관찰되었으며, 이는 순수한 Z33 펩티드에 제시된 바와 같이 자가-조립된 상태의 Z33 세그먼트의 α-나선 이차 구조의 형성을 암시한다. IF의 CD 스펙트럼 및 측정된 직경을 기초로 하여, IF로 패킹되는 경우 펩티드가 이의 α-나선 이차 구조로 유지된 것으로 추론하는 것이 합리적이다. PBS 용액 또는 IgG 용리 완충액에서 C12-Z33에 대한 CD 스펙트럼은 부분적 α-나선 신호만 유지했으나, 동일 완충액 내의 Z33 펩티드와 비교하여 약 222 nm 및 208 nm에서의 2개의 음성 피크의 타원율이 변경되었다는 점에 주목할 가치가 있다. CD 스펙트럼의 이동은 Z33 세그먼트의 분자 패킹을

이의 자유 상태로부터 변화시킬 수 있는 IF의 형성으로부터 발생할 수 있고, 이는 이후 결합 부위에 필요한 특정한 입체형태로 인해 IgG에 대한 이의 결합 친화성에 영향을 미칠 수 있다.

[0071] 실시예 3

[0072] IF의 결합 친화성 측정을 위한 ITC 실험. IF로의 통합 후 Z33 펩티드의 이차 구조에서의 입체형태 변화를 고려하면, C12-Z33 IF의 형성이 본래의 Z33 펩티드에 존재하는 IgG 결합 능력에 영향을 미치는지 아는 것이 매우 흥미롭다. 자가-조립된 C12-Z33 IF의 결합 친화성을 조사하기 위해, IgG1에 대한 결합의 열역학적 특성을 등온 적정 열량측정법(ITC)에 의해 조사하였다. ITC는 많은 수의 단백질과 리간드 사이의 결합 사건을 모니터링하는데 널리 이용되어 왔으며[43-45], 이는 C12-Z33 IF와 IgG1 사이에 결합이 발생할 수 있는지 조사하는 우수한 방법이다.[46-47] 결합 반응과 관련된 열이 단계적 주입 동안 기록되었으며, 열역학적 해리 상수(K_d), 몰 엔탈피 변화(ΔH°), 및 화학량론(N)을 포함하는 열역학적 파라미터가 직접 획득될 수 있다.[44]

[0073] 표 1. pH 7.4의 포스페이트-완충 염수에서 15℃에서 IgG1에 대한 Z33-기반 리간드의 결합에 대한 열역학적 파라미터. 리간드 당 데이터가 보고된다.

리간드	K_d (nM)	ΔG° (kcal·mol^{-1})	ΔH° (kcal • mol^{-1})	$-T\Delta S^\circ$ (kcal • mol^{-1})	N
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

[0074]

[0075] **표 2.** pH 7.4의 포스페이트-완충 염수에서 15℃에서 IgG1에 대한 Z33-기반 리간드의 결합에 대한 열역학적 파라미터. IgG1 당 데이터가 보고된다.

리간드	K_d (nM)	ΔG° (kcal·mol^{-1})	ΔH° (kcal·mol^{-1})	$-T\Delta S^\circ$ (kcal·mol^{-1})
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

[0076]

[0077] 전형적인 ITC 실험에서, PBS 완충액 중 100 μM C12-Z33의 용액을 밤새 숙성시킨 후, 15℃, pH 7.4에서 동일 완충액 중 2 μM IgG1의 용액에 주입하였다. 전형적인 써모그램(thermogram) 및 결합 등온선이 도 3A에 제시되어 있으며, 리간드 당 보고된 열역학적 파라미터는 표 1에 요약되어 있다. IgG1에 대한 C12-Z33 IF의 결합에 대한 ITC 결과는 650의 K_d를 특징으로 하는 엔탈피 유도 결합 사건을 나타내었다. C12-Z33 IF의 결합 효율을 추가로 비교하기 위해, 본 발명자는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 43 nM의 K_d로 IgG1에 단단히 결합하는 것으로 입증된 Z33 펩티드를 합성하였다. IgG1에 대한 Z33 펩티드의 결합 특성을 PBS, pH 7.4에서 15℃에서 ITC에 의해 측정하였고, 전형적인 써모그램 및 결합 등온선이 도 3C에 제시되어 있다. 100배 더 나은 친화성에 더하여, Z33에 대한 화학량론은 2.3인 반면, C12-Z33에 대한 겉보기 화학량론은 3.1이었으며, 이는 IF의 모든 C12-Z33이 IgG1 분자에 대한 결합에 이용 가능한 것이 아님을 나타낸다. IgG1에 결합할 수 있는 C12-Z33 분자의 효율은 Z33의 화학량론을 C12-Z33의 화학량론으로 나누어 74.2%인 것으로 추정될 수 있다.

[0078] 리간드 당 표준화는 결합의 겉보기 화학량론의 결정을 가능하게 하지만, 표 2에 제시된 바와 같이 IgG의 몰 당 표준화 후에 열역학적 파라미터의 비교가 수행되어야 한다. IgG에 대한 Z33의 결합은 큰 바람직하지 않은 엔트로피 변화에 반대되는 큰 유리한 엔탈피를 특징으로 하였다. 엔탈피 및 엔트로피 변화의 크기는 더 작았으나 C12-Z33의 결합에 대한 열역학적 특징은 유사하였다. C12-Z33은 Z33보다 덜 바람직하지 않은 엔트로피로 결합하나, 바람직한 엔탈피의 손실은 훨씬 더 커서, 전반적으로 낮은 결합 친화성을 발생시킨다. 유리한 결합 엔탈피의 전반적인 손실은 IF의 파괴와 관련된 바람직하지 않은 엔탈피에 의해 야기될 수 있다. IF의 제한으로 인해 IgG1과의 유리한 상호작용이 제한될 가능성이 또한 존재한다. C12-Z33에 의한 IgG1의 적정을 또한 IF로부터의 용리에 적합한 낮은 pH에서의 유의하게 더 낮은 결합 친화성을 입증하기 위해 15℃에서 IgG 용리 완충액(pH

2.8)에서 수행하였다(도 3B).

[0079] IF와 IgG1 사이의 비-특이적 결합을 배제하기 위해, 스크램블링된 Z33 펩티드 서열을 갖는 C12-SZ33을 음성 대조군으로 사용하였다. 이러한 C12-SZ33 IA는 유사한 자가-조립 특성 및 TEM 및 CD로 특성규명된 이차 구조를 나타낸다(데이터는 제시하지 않음). pH 7.4의 PBS 중에서 15℃에서 2 μM IgG1 용액에 100 μM C12-SZ33 IA를 주입하여 이의 결합 능력을 측정함으로써 ITC 실험을 수행하였다. 도 3D의 써모그램 및 결합 등온선은 IgG1과 Z33 펩티드 사이의 특정 상호작용을 암시한다.

[0080] 실시예 4

[0081] IF의 기능의 보편성을 추가로 입증하기 위해, 이중 사슬 알킬화 IA 2C8-Z33을 또한 자가-조립 특성으로부터 IgG1에 대한 결합 친화성까지 연구하였다(도 4A-E). 균일한 직경을 갖는 나노규모 IF가 TEM 이미지에서 관찰되었고, α-나선 이차 구조가 CD에 의해 확인되었다. ITC 결과로부터, PBS, pH 7.4에서 15℃에서 2C8-Z33과 IgG1 사이에 결합이 발생한 반면, 용리 완충액, pH 2.8에서는 검출 가능한 결합이 발생하지 않았다. 2C8-Z33의 결합에 대한 겉보기 화학량론은 9.1이었으며, 이는 훨씬 더 낮은 효율의 결합을 나타낸다. 2C8-Z33은 C12-Z33보다 덜 유리한 결합 엔탈피로 결합하나, 엔트로피로부터의 기여는 덜 바람직하지 않아서, 약간 더 나은 결합 친화성을 발생시킨다(표 2). 상기 논의된 결과로부터, 본 발명자는 표면에 제시된 고밀도의 결합 부위로, 자가-조립된 IF가 본래의 Z33 펩티드에서 나타난 바와 같이 IgG1에 대한 유리한 결합 능력을 유지할 수 있음을 입증하였다. 그럼에도 불구하고, 엔탈피 기원인 IF에 대해 관찰된 전체 결합 친화성의 손실이 존재한다. 유리한 엔탈피에서의 손실은 IF의 제한으로 인한 상호작용의 손실 및 입자의 파괴와 관련된 바람직하지 않은 엔탈피 기여에 의해 설명될 수 있다. IF 내의 분자 수준 패킹은 생물활성에서의 성능에 크게 영향을 줄 수 있는 기능적 특성 뿐만 아니라 이의 형태학적 특성을 결정한다.

[0082] 실시예 5

[0083] IgG 분자의 정제를 위한 잠재적 적용.

[0084] 구성 아미노산의 다양성은 수소 결합, π-π 스태킹, 소수성 붕괴, 및 자가-조립 펩티드 나노섬유 사이의 정전기적 상호작용을 포함하는 비-공유적 상호작용에 대한 광범위한 기초를 제공한다. 예를 들어, 산성 및 염기성 아미노산의 용해도는 pH 및 이온 강도 의존적인 특성인 이온화 정도에 의해 결정된다. 따라서, 하전된 펩티드의 자가-조립 공정은 pH를 조정하거나, 염을 첨가하여 정전기적 반발을 감소시키고, 응집 및 심지어 침전을 촉진함으로써 촉진될 수 있다. Z33 펩티드에 제시된 다수의 하전된 아미노산 잔기를 고려하면, 본 발명의 면역섬유 시스템의 매력적인 장점은 용이하게 조정 가능한 용해도에 의존한다는 것이다. 일단 IgG가 IF에 결합하면, IgG-IF 복합체는 높은 이온 강도를 갖는 염을 첨가함으로써 침전될 잠재성이 높다(도 5A).

[0085] C12-Z33 IF는 이의 IgG1에 대한 상대적으로 높은 결합 친화성으로 인해 IgG1을 침전시킬 가능성을 연구하기 위해 선택되었다. 도 5B(i-ii)에 제시된 바와 같이, 5 mM C12-Z33은 PBS 용액에 잘 용해될 수 있으나, 0.6 M Na_2SO_4의 PBS 용액에서 침전된다. PBS 용액 중 C12-Z33의 제타 전위는 -7.61 mV이며, Na_2SO_4의 첨가는 IF의 표면 상의 전하를 차단하여, 이에 따라 침전을 유도할 수 있다. IgG1의 경우, 이는 5 mM C12-Z33 뿐만 아니라 0.6 M Na_2SO_4에 잘 용해된다. 그러나, 5분 동안 20 μM IgG1 및 5 mM C12-Z33을 혼합한 후, 0.6 M Na_2SO_4를 첨가한 후 침전이 관찰되었다. 침전물의 조성을 결정하기 위해, 2개의 병행 실험을 수행하였다. 0.6 M Na_2SO_4 중 5 mM C12-Z33을 원심분리하고, 자외선-가시광선(UV-Vis) 분광법을 이용하여 Na_2SO_4의 첨가 전 및 후에 280 nm에서 상층액의 흡광도 변화를 모니터링하였다. 0.6 M Na_2SO_4 중 5 mM C12-Z33 and 20 μM IgG1의 혼합물에 대해 동일 절차를 수행하였다. 도 5C에 제시된 바와 같이, 대부분의 C12-Z33 IF는 0.6 M Na_2SO_4에 의해 침전될 수 있었다. IgG1-IF 복합체 시스템의 경우, 280 nm에서의 흡광도는 IgG1의 초기 흡광도보다 낮은 수준으로 감소되었고, 이는 용액으로부터의 IgG1의 제거를 나타낸다. 보다 명확하게는, 순수한 IgG1의 상층액의 흡광도를 청색 선으로부터 녹색 선의 값을 공제함으로써 플로팅하였고, 이는 60% 초과의 IgG1이 상층액으로부터 제거된 것을 암시한다. 지금까지, 본 발명의 IF가 새로운 친화성 침전제 역할을 할 가능성이 예비 입증되었다.

[0086] 실시예 6

[0087] 본 발명의 IF에 대한 IgG 결합의 확인.

[0088] TEM에서 IgG 구조를 확인하는 어려움은 면역섬유와 IgG 사이의 결합의 시각화를 직접적으로 제한하였다. IgG가 면역섬유의 표면 상에 존재함을 확인하기 위해, 미리 형성된 C12-Z33 및 C12-SZ33 면역섬유를 2시간 동안 10 nm

IgG-표지된 Au 나노입자와 함께 2시간 동안 별도로 인큐베이션하였다. 각각의 용액의 점적을 TEM 격자 상에 놓은 후, 격자를 여과지로 블로팅하고, 자연 건조시켰다. 이후, 본 발명자는 우라닐 아세테이트로 샘플을 염색하기 전에 결합되지 않은 Au 나노입자를 제거하기 위해 PBS 완충액으로 격자를 3회 조심스럽게 세척하였다. 밀집 및 드문(도 6A 및 6C) 영역 둘 모두에서 IgG-코팅된 Au 나노입자와 함께 인큐베이션된 C12-Z33의 TEM 이미지는 Z33을 나타내는 나노섬유의 표면에 대한 IgG의 결합을 확인하였다. 스크램블링된 Z33 서열을 갖는 대조군 나노섬유에 매우 적은 Au 나노입자가 부착되는 것으로 관찰되었다(도 6B 및 6D). 이러한 연구는 C12-Z33 면역섬유 및 IgG-코팅된 Au 나노입자의 공동-국소화가 실제로 특이적 결합의 결과임을 암시한다. Au 나노입자의 밀도는 긴 면역섬유에서 비교적 낮았으며, 이는 아마도 나노섬유로의 이들의 자가-조립 후 Z33 면역-양친매성 분자의 단단한 패킹의 제한된 접근성으로 인한 것일 수 있음이 인지되어야 한다. 또 다른 가능성은 IgG-코팅된 Au 나노입자에서 IgG 농도(0.33-0.66 μM)가 2-5 μM인 C12-Z33에 대한 임계 마이셀 농도보다 낮으므로(도 7), IgG-코팅된 Au 나노입자가 단량체 상태의 C12-Z33에 결합될 수 있고, 이후 세척 단계에서 제거될 수 있다는 것이다.

[0089] 실시예 7

[0090] 본 발명의 IF와의 IgG 상호작용의 시각화.

[0091] C12-Z33 면역섬유와 IgG 사이의 상호작용을 더 잘 시각화하기 위해, 형광 염료(로다민 B)를 이용한 C12-Z33의 표지화는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 하에서 형광 면역섬유 및 FITC-IgG의 직접적인 영상화를 가능하게 한다. 로다민 B는 생체물질 염색에 광범위하게 사용되어 왔다. Z33의 N-말단에 리신을 첨가하여 로다민 B 표지된 C12-Z33(RB-C12-Z33)을 합성하였다(도 8). 로다민 B 및 C12를 새로이 첨가된 리신의 측쇄 상의 아미노기 및 백본에 개별적으로 컨쥬게이션시켰다. 형광 표지는 C12-Z33의 결합 능력을 방해하지 않을 것으로 추정되었는데, 이는 염료가 C12와 함께 면역섬유로의 자가-조립 후에 소수성 코어에 머무를 것이고, 결합 서열 Z33로부터 원위에 존재하기 때문이다. PBS 중 자가-조립된 섬유성 형태는 TEM을 이용하여 확인되었다(도 9C). 1 mM 스톡 용액으로부터 희석된 100 μM RB-C12-Z33 및 2 μM FITC-IgG를 PBS에서 사전 혼합하였다. 영상화 직전에 깨끗한 현미경 슬라이드에 30 μl 용액을 스포팅하고, 커버슬립을 덮어 얇은 층의 액체를 획득하였다. 이후, 형광 이미지(도 10A-C)를 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 찍었고, 이는 RB-C12-Z33(적색) 및 FITC-IgG(녹색) 둘 모두로부터의 형광 신호의 공동-국소화를 나타내었다. FITC-IgG는 순수한 FITC-IgG 용액 및 동일 조건에서 C12-SZ33과 함께 인큐베이션된 용액에서 관찰되지 않은 큰 밝은 조립을 형성한 것으로 밝혀졌다(데이터는 제시하지 않음). RB-C12-Z33과 함께 인큐베이션되는 경우 FITC-IgG의 밝은 형광과 비교하여, 낮은 형광 신호가 PBS 용액에서 또는 C12-SZ33와의 인큐베이션 후에 검출되었다. 이는 FITC-IgG가 PBS 완충액 또는 C12-SZ33의 존재하에서 잘 분산된 반면, RB-C12-Z33과 FITC-IgG 사이의 결합이 FITC-IgG의 응집 및 강한 형광을 유도한 것을 나타내었다.

[0092] 본원에 인용된 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은 각각의 참고문헌이 참조로서 포함되는 것으로 개별적 및 구체적으로 표시되고, 이의 전체내용이 본원에 기재되는 것과 동일한 정도로 참조로서 본원에 포함된다.

[0093] 본 발명을 기재하는 상황(특히, 하기 청구항의 상황)에서의 단수 용어 및 유사한 언급의 사용은 본원에서 달리 나타내거나 문맥에 명백히 모순되지 않는 한 단수 및 복수 둘 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "포함하는", "갖는", "포함하는" 및 "함유하는"은 달리 언급되지 않는 한 개방형 용어(즉, "포함하지만, 이에 제한되지는 않음"을 의미함)로 해석되어야 한다. 본원에서의 값의 범위의 언급은 단지 본원에서 달리 나타내지 않는 한 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 언급하는 속기 방법을 제공하기 위한 것이며, 각각의 개별 값은 개별적으로 본원에 언급되는 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 나타내거나, 문맥에 명백히 달리 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의 및 모든 예, 또는 예시적 언어(예를 들어, "예를 들어")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 예시하기 위한 것이며, 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에 대해 제한을 두고자하는 것이 아니다. 명세서 내의 어떤 언어도 본 발명을 실시하는데 필수적인 것으로 임의의 청구되지 않은 구성요소를 나타내는 것으로 해석되어선 안 된다.

[0094] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자에게 공지된 최상의 방식을 포함하는 본 발명의 바람직한 구현예가 본원에 기재된다. 이들 바람직한 구현예의 변형은 상기 기재를 읽는 경우 당업자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자는 당업자가 상기 변형을 적절하게 이용할 것으로 예상하며, 본 발명자는 본원에 구체적으로 기재된 것과 달리 본 발명을 실시하고자 한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구범위에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 모든 가능한 변형의 상기 기재된 요소의 임의의 조합이 본원에 달리 지시되지 않는 한 또는 문맥에 의해 달리 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 의해 포함된다.

[0095] 참고문헌

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.

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.

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.

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.

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.

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

[0096]

2016, 320, 2-17.

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

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.

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.

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.

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.

12. Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I., Self-assembly and mineralization of peptideamphiphile nanofibers. Science 2001, 294 (5547), 1684-1688.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

[0097]

Circulation 2013, 128 (Suppl 22), A19043-A19043.
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.
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.
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.
22. Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L., The therapeutic monoclonal antibody market. MAbs 2015, 7 (1), 9-14.
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.
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.
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-. ANG resolution. Biochemistry 1981, 20 (9), 2361-2370.
26. Moks, T.; ABRAHMSÉN, L.; NILSSON, B.; Hellman, U.; SJÖQUIST, J.; Uhlen, M., Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. European Journal of Biochemistry 1986, 156 (3), 637-643.
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.
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.
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.
30. Olszewski, K. A.; Kolinski, A.; Skolnick, J., Folding simulations and computer redesign of protein A three-helix bundle motifs. Proteins 1996, 25.

[0098]

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.
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.
33. Guatrecasas, P., Protein purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem 1970, 245 (12), 3050.
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.
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.
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.
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.
38. Eisen, H. N.; Siskind, G. W., Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response*. Biochemistry 1964, 3 (7), 996-1008.
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.
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.
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.
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.

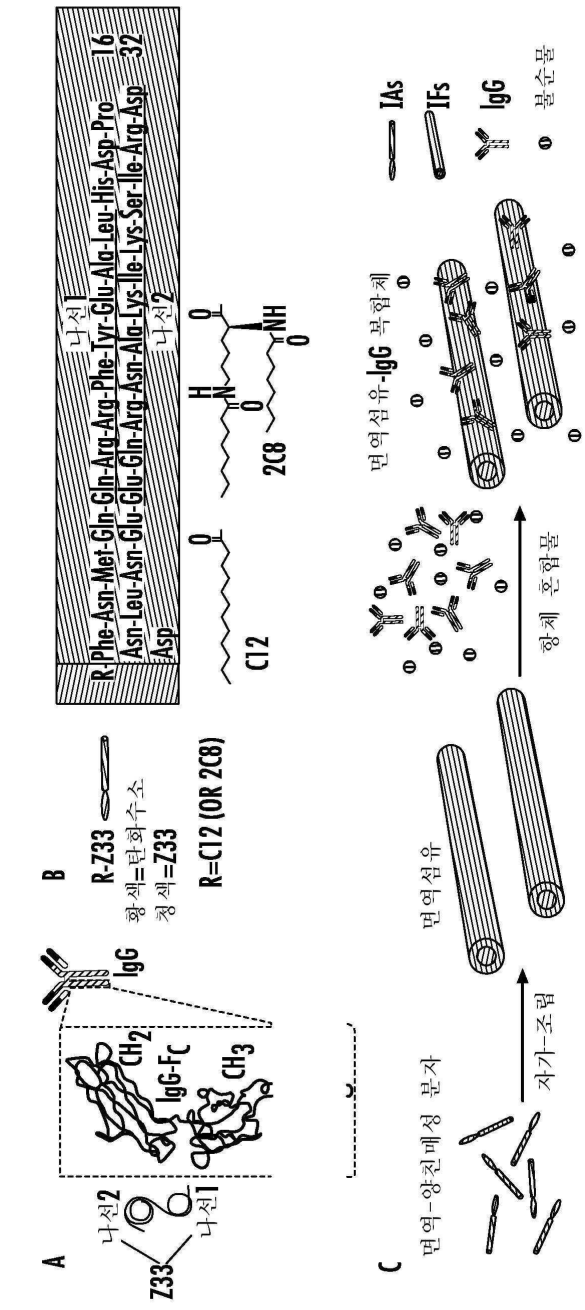
[0099]

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.
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.
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.
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.
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.

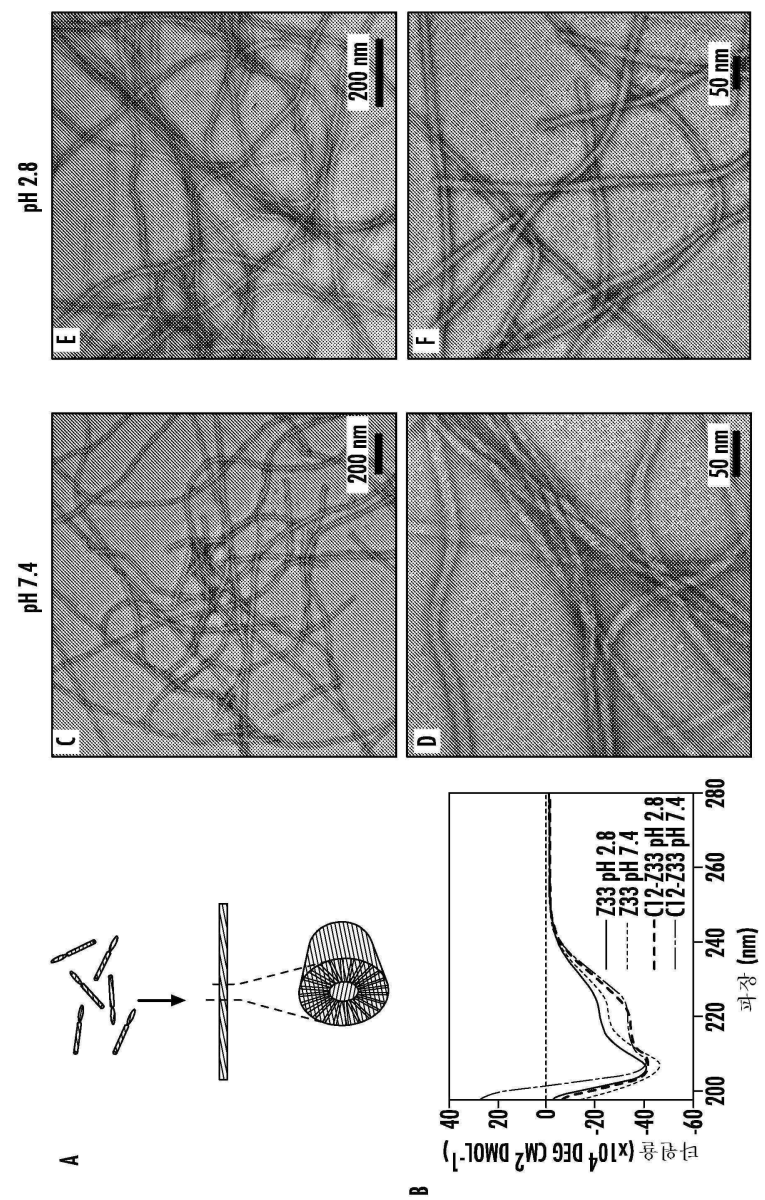
[0100]

도면

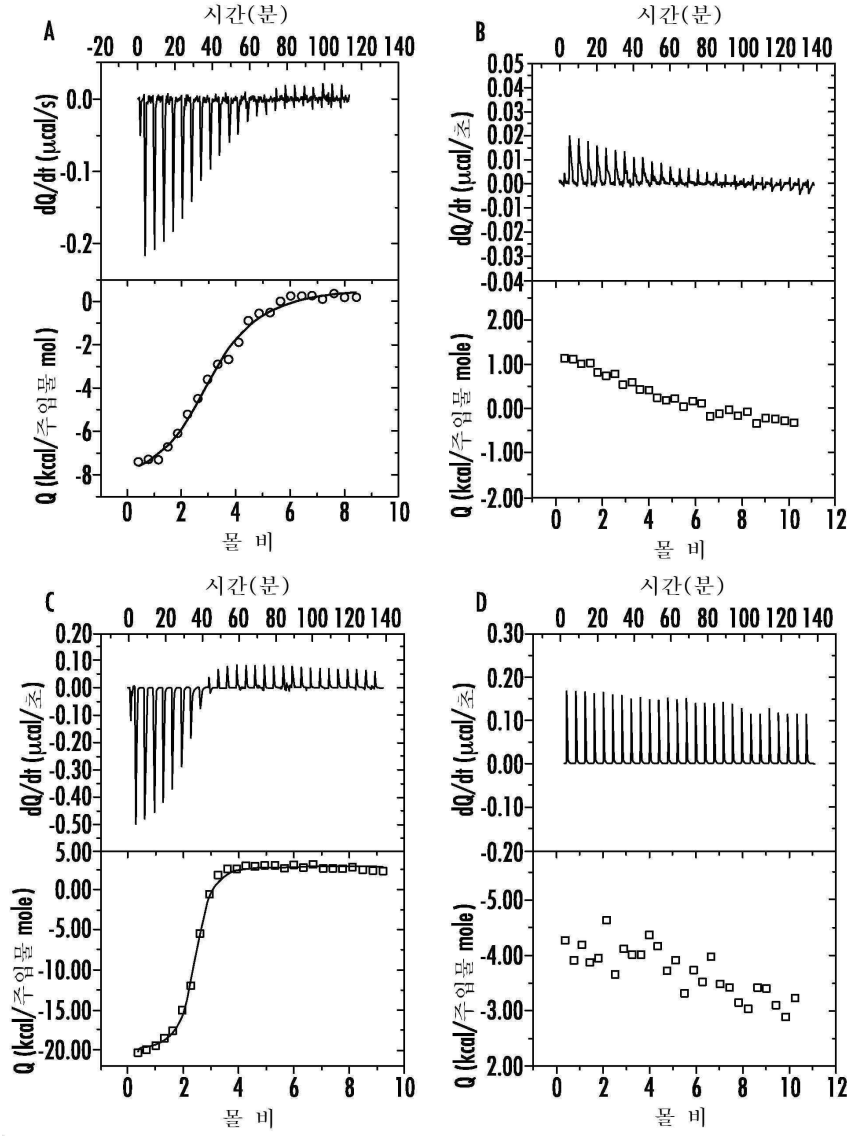
도면1


A
나선2
Z33
나선1
IgG
CH2
IgG-Fc
CH3
B
R-Z33
황색=탄화수소
청색=Z33
R=C12 (OR 2C8)
나선1
R-Phe-Asn-Met-Gln-Gln-Arg-Arg-Phe-Tyr-Glu-Ala-Leu-His-Asp-Pro 16
Asn-Leu-Asn-Glu-Glu-Gln-Arg-Asn-Ala-Lys-Ile-Lys-Ser-Ile-Arg-Asp 32
Asp
나선2
C12
2C8
C
면역-양친매성 분자
자가-조립
면역섬유
항체 혼합물
면역섬유-IgG 복합체
IAs
IFs
IgG
불순물

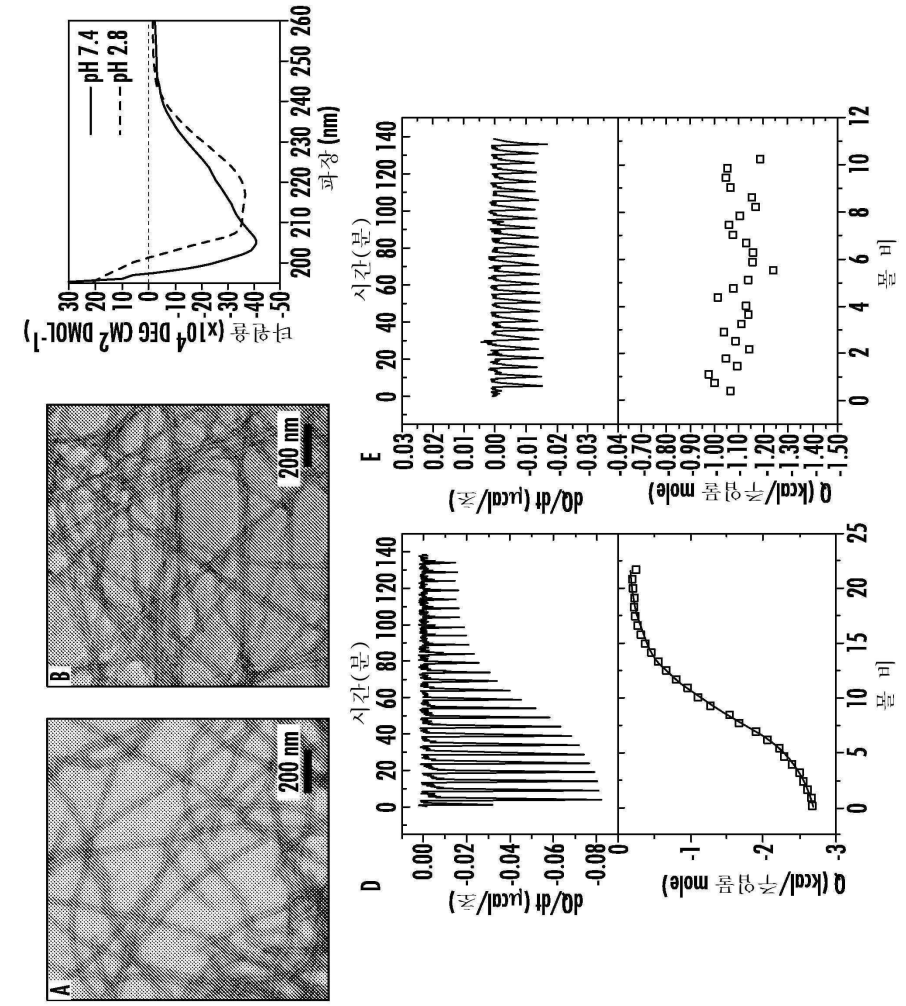
도면2


pH 2.8
pH 7.4
A
B
C
D
E
F
200 nm
50 nm
타원율 (x10⁴ DEG CM² DMOL⁻¹)
파장 (nm)
Z33 pH 2.8
Z33 pH 7.4
C12-Z33 pH 2.8
C12-Z33 pH 7.4

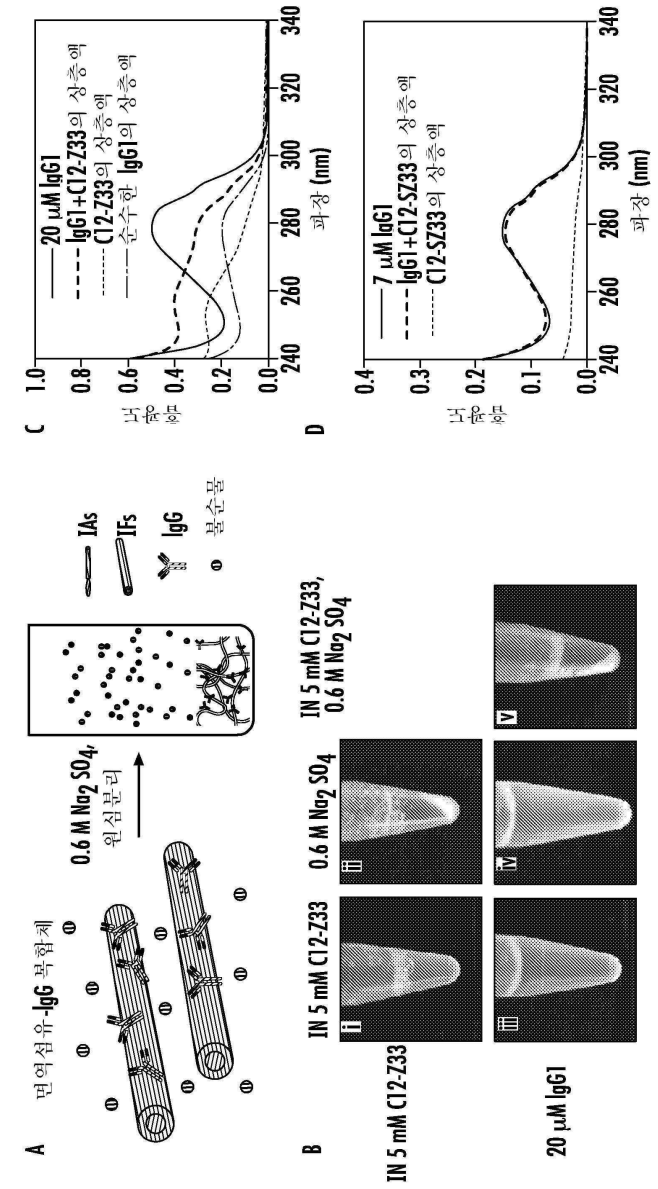
도면3


A
시간(분)
-20 0 20 40 60 80 100 120 140
dQ/dt (μcal/s)
0.0
-0.1
-0.2
Q (kcal/주입몰 mol)
0
-2
-4
-6
-8
0 2 4 6 8 10
몰 비
B
시간(분)
0 20 40 60 80 100 120 140
dQ/dt (μcal/초)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
-0.02
-0.03
-0.04
Q (kcal/주입몰 mole)
2.00
1.00
0.00
-1.00
-2.00
0 2 4 6 8 10 12
몰 비
C
시간(분)
0 20 40 60 80 100 120 140
dQ/dt (μcal/초)
0.20
0.10
0.00
-0.10
-0.20
-0.30
-0.40
-0.50
Q (kcal/주입몰 mole)
5.00
0.00
-5.00
-10.00
-15.00
-20.00
0 2 4 6 8 10
몰 비
D
시간(분)
0 20 40 60 80 100 120 140
dQ/dt (μcal/초)
0.30
0.20
0.10
0.00
-0.10
-0.20
Q (kcal/주입몰 mole)
-5.00
-4.00
-3.00
2.00
0 2 4 6 8 10 12
몰 비

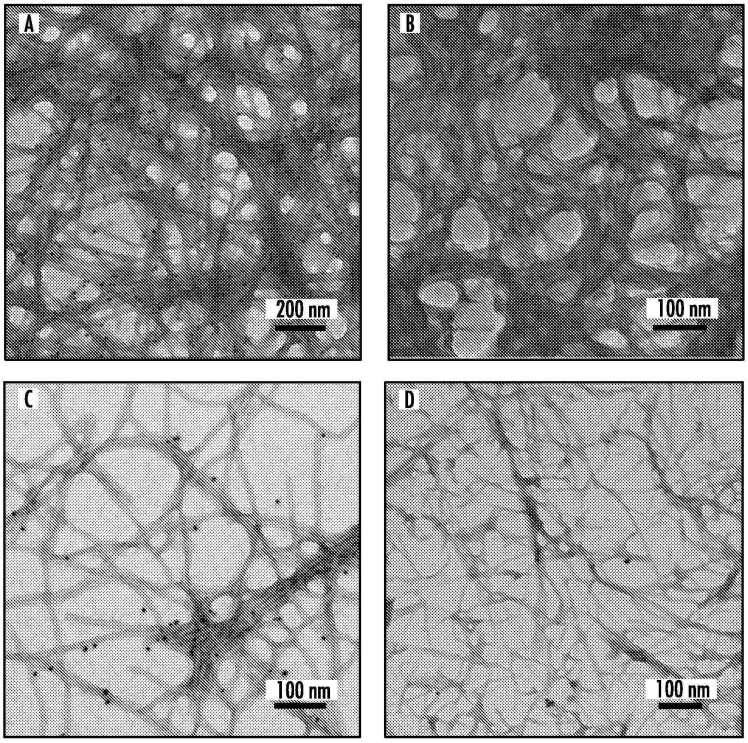
도면4


A
200 nm
B
200 nm
타원율 (x10⁴ DEG CM² DMOL⁻¹)
pH 7.4
pH 2.8
파장 (nm)
D
dQ/dt (μkcal/초)
Q (kcal/주입물 mole)
시간(분)
몰 비
E
dQ/dt (μkcal/초)
Q (kcal/주입물 mole)
시간(분)
몰 비

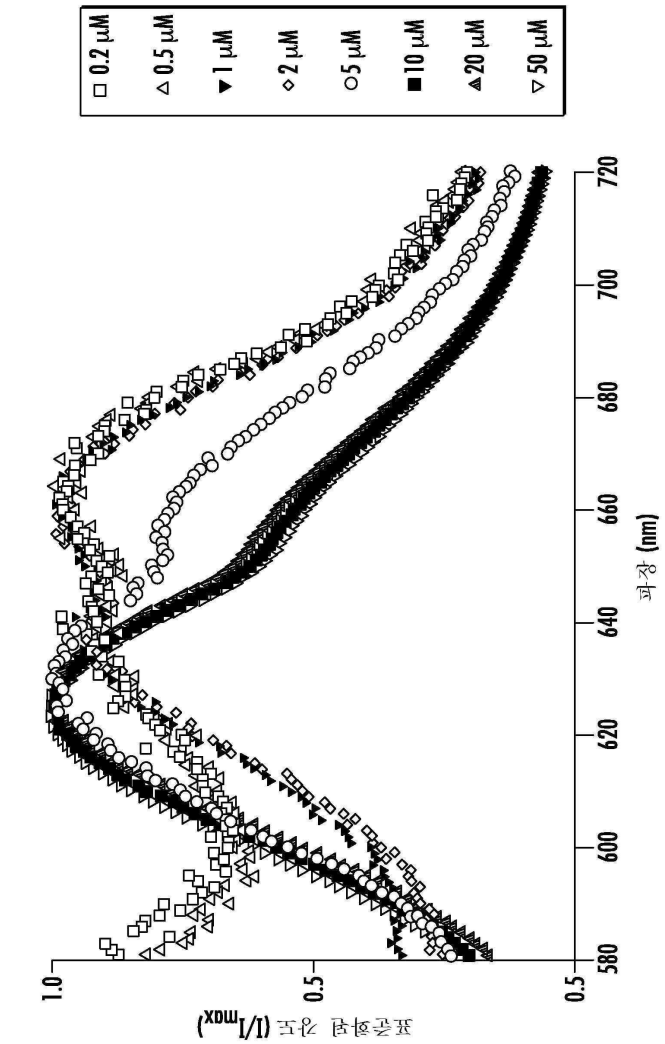
도면5


A
B
C
D
편역섬유-IgG 복합체
0.6 M Na2 SO4,
원심분리
IAs
IFs
IgG
불순물
IN 5 mM C12-Z33
0.6 M Na2 SO4
IN 5 mM C12-Z33,
0.6 M Na2 SO4
20 μM IgG1
20 μM IgG1
IgG1+C12-Z33의 상층액
C12-Z33의 상층액
순수한 IgG1의 상층액
흡광도
파장 (nm)
7 μM IgG1
IgG1+C12-SZ33의 상층액
C12-SZ33의 상층액

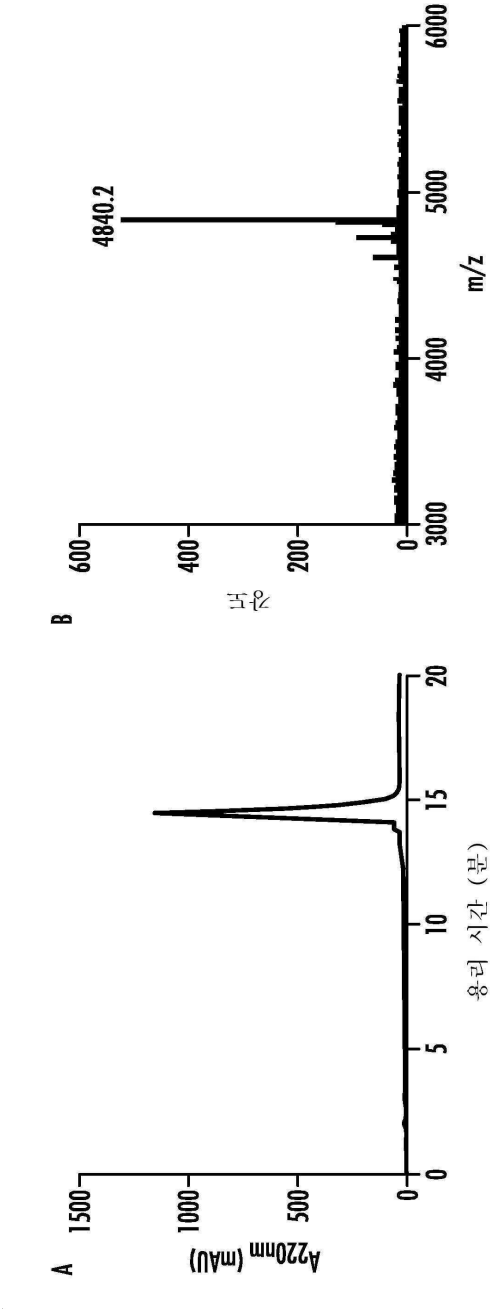
도면6



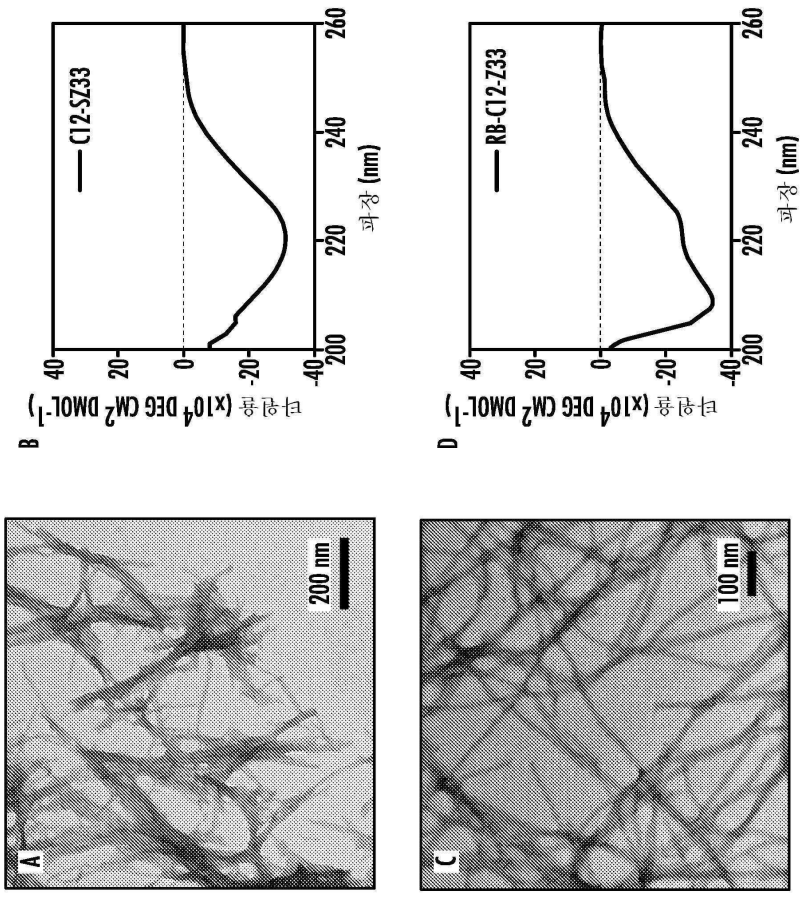
도면7


□ 0.2 μM
△ 0.5 μM
▼ 1 μM
◇ 2 μM
○ 5 μM
■ 10 μM
▲ 20 μM
▽ 50 μM
표준화된 강도 (I/I$_{max}$)
1.0
0.5
0.5
580
600
620
640
660
680
700
720
파장 (nm)

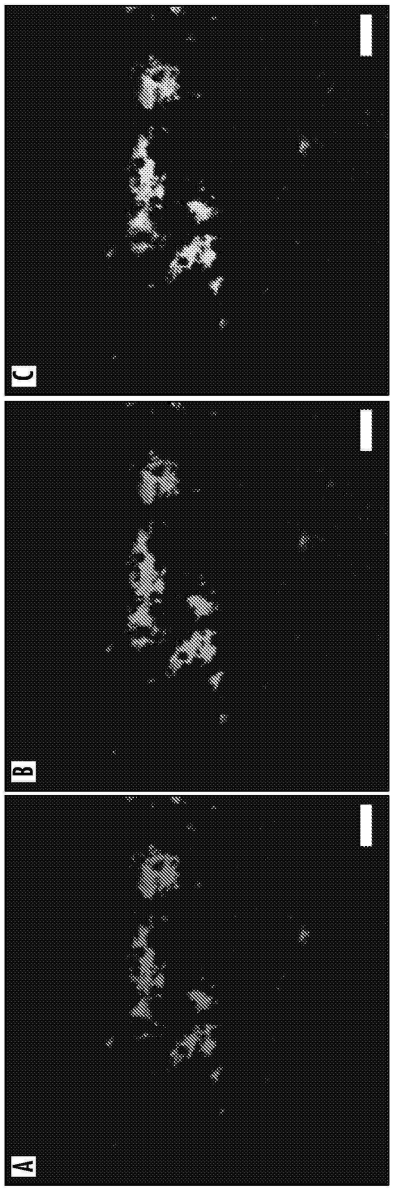
도면8


A
A220nm (mAU)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
용리 시간 (분)
B
강도
600
400
200
0
4840.2
3000
4000
5000
6000
m/z

도면9


A
200 nm
B
C12-SZ33
타원율 (x10⁴ DEG CM² DMOL⁻¹)
파장 (nm)
C
100 nm
D
RB-C12-Z33
타원율 (x10⁴ DEG CM² DMOL⁻¹)
파장 (nm)

도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Johns Hopkins Technology Ventures

<120> A SUPRAMOLECULAR HIGH AFFINITY PROTEIN-BINDING SYSTEM FOR PURIFICATION OF BIOMACROMOLECULES

<130> P14162-01

<150> 62/478,886

<151> 2017-03-30

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 1

Phe Asn Met Gln Gln Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15

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

Asp

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 2

Ile Lys Val Ala Val
1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 3

Arg Gly Asp Ser
1