



등록특허 10-2767190



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월11일

(11) 등록번호 10-2767190

(24) 등록일자 2025년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/31 (2006.01) B01D 15/38 (2006.01)

B01J 20/24 (2006.01) B01J 20/28 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/31 (2013.01)

B01D 15/3809 (2025.01)

(21) 출원번호 10-2020-7007663

(22) 출원일자(국제) 2018년08월17일

심사청구일자 2021년08월12일

(85) 번역문제출일자 2020년03월16일

(65) 공개번호 10-2020-0038298

(43) 공개일자 2020년04월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/046924

(87) 국제공개번호 WO 2019/036631

국제공개일자 2019년02월21일

(30) 우선권주장

62/547,256 2017년08월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US06197927 B1*

D. Missirlis et al, Biochemistry, 2009, 48, 3304-3314 1부.*

US20090214421 A1

US20110201112 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 존스 홉킨스 유니버시티

미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400

브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니

미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스턴, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드

(72) 발명자

쿠이, 홍강

미국 21093 메릴랜드 루더빌 바츠 코트 10

리, 이

미국 21211 메릴랜드 볼티모어 비치 애비뉴 3925 아파트먼트 411

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 6 항

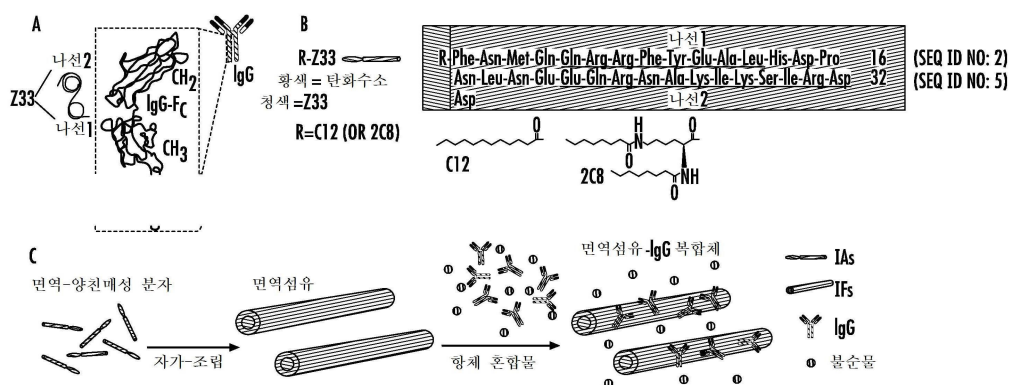
심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 단백질 정제를 위한 초분자 필라멘트 조립체

(57) 요약

본 발명은 단백질 또는 펩티드 정제를 위한 신규한 면역섬유 조성물 및 이들 조성물을 사용하는 간단하고 비용-효율적인 방법 및 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 면역섬유는 표면에 생물활성 에피토프를 갖는 면역섬유 내로 수용액에서 조립되고 펩티드 또는 단백질 결합 능력을 갖는 면역-양친매성 분자를 작제하는데 사용되는 스타필로코커스 아우레우스 단백질 A로부터 유래된 맞춤형 Z-33 펩티드를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

B01J 20/24 (2013.01)

B01J 20/28023 (2013.01)

C07K 1/22 (2013.01)

(72) 발명자

락, 리 린

미국 01754 매사추세츠 메이나드 파인 스트리트 15
유니트 1디

수, 수안쿠오

미국 01719 매사추세츠 박스버리 콜로니얼 릿지 드
라이브 118

리, 첵지안

미국 01776 매사추세츠 서드버리 브루스터 로드 67

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 면역섬유 조성물로서, 상기 면역-양친매성 분자가 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A의 Z33 펩티드로부터 유래되고 SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 및 7로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 탄화수소 사슬은 C8, C12, C16, 또는 2C8인, 면역섬유 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역-양친매성 분자가 산성이 아닌 pH의 수용액에 있을 때 α -나선 입체형태를 갖는 면역섬유 조성물.

청구항 3

면역섬유 결합 분자를 포함하는 면역섬유 조성물로서, 상기 결합 분자가 N-말단에서 C12 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하고, 상기 항체 결합 펩티드가 제1 스페이스 펩티드에 컨쥬게이션되고 제1 스페이스 펩티드의 C-말단에서 스타필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 아미노산 서열 FNMQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD(SEQ ID NO: 1)를 포함하는 항체 결합 펩티드에 컨쥬게이션되며, 상기 제1 스페이스 펩티드가 VVKGG의 일반 아미노산 서열을 포함하고,

면역섬유 조성물이 VVEE의 일반 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 서열에 컨쥬게이션된 C12 탄화수소 사슬을 N-말단에 갖는 스페이스 분자를 추가로 포함하는, 면역섬유 조성물.

청구항 4

하기 단계를 포함하는 항체 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질의 정제를 위한 방법으로서,

- 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항을 포함하는 샘플을 수용액 및 산성이 아닌 pH에 용해시키고 에이징시켜 IF로 자가-조립되도록 하는 단계;
- 항체를 함유하는 샘플을 IF 용액과 혼합하고, IF가 면역글로불린 분자의 Fc 부분 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질에 결합하도록 하여 용액 중에 면역섬유-Fc 면역글로불린 또는 면역섬유-Fc 함유 펩티드 또는 단백질 복합체를 형성하는 단계;
- 염을 첨가하고 원심분리함으로써 면역섬유-Fc 면역글로불린 또는 면역섬유-Fc 함유 펩티드 또는 단백질 복합체를 용액으로부터 분리하는 단계;
- 면역글로불린 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질로부터 IF를 해리하고 결합되지 않은 면역글로불린 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, IF가 pH를 용리 조건으로 낮추고 여과, 미세여과, 또는 초미세여과에 의해 면역글로불린 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질로부터 분리되는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 면역글로불린 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질이 연마 단계를 사용하여 추가로 정제되는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 2017년 8월 18일에 출원된 U.S. 가특허 출원 번호 62/547,256호의 이익을 주장하며, 이는 모든 목적을 위해 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 8월 17일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P14755-02_ST25.txt로 명명되며, 크기는 2,433 바이트이다.

배경 기술

[0005] 발명의 배경

[0006] 일차원(1D) 나노구조로 자가-조립될 수 있는 양친매성 펩티드 또는 펩티드 컨쥬게이트는 중요한 생체의학 응용으로 인해 지난 20년 동안 광범위하게 조사되어 왔다. 생성된 자가-조립된 나노구조가 생물학과 접촉할 수 있는 능력을 갖도록 하기 위해, 다양한 생물활성 펩티드가 분자 설계에 통합되었다. 그러나, 적절한 기능에 필요한 초분자 표면에 표시되는 생물활성 펩티드의 이차 구조를 정확하게 제어하는 것이 여전히 과제로 남아있다. 일반적으로, 최종 자가-조립된 형태는 소수성 상호작용, 수소 결합, 정전기적 상호작용, 및 $\pi-\pi$ 스택킹을 포함할 수 있는 몇몇 상호작용 인자에 의해 결정된다. 펩티드-기반 1D 나노구조의 경우, β -시트 모티프는 종종 생성된 조립체의 이방성 성장을 위한 분자간 수소 결합을 제공하기 위해 사용된다. 단백질의 또 다른 필수 성분이자 많은 중요한 생체분자 상호작용의 핵심 매개체인 α -나선 펩티드도 초분자 나노구조를 생성하기 위해 덜 빈번하게 사용되었다. 예를 들어, Tirrell 및 동료들은 상당한 α -나선성을 갖는 원통형 마이셀 및 단백질 유사 마이셀을 설계하였다. 또한, 용매 특성, 소수성 꼬리, 또는 열 이력을 조정함으로써, 무작위 코일, α -나선, 및 β -시트와 같은 다양한 구조 중에서 자가-조립 펩티드 나노구조의 전이가 때때로 보고되었다. 이러한 중요한 진전에도 불구하고, 초분자 조립체 내에서 α -나선 펩티드의 본질적인 열역학적 불안정성 및 구조적 불확실성에 대한 우려는 여전히 남아있다.

[0007] α -나선 이차 구조는 알킬 사슬의 컨쥬게이션에 의해 안정화될 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, 알킬 사슬의 수를 조정함에 의해 하나의 펩티드에서 α -나선으로부터 β -시트로의 전이는 거의 관찰되지 않았다.

[0008] 자가-조립 펩티드 모티프의 C- 또는 N-말단 상의 생물활성 펩티드의 이러한 직접 배치는 특정 생체의학 적용을 위한 생물활성 재료를 생성시키는 인기 있는 전략이 되었다. 펩티드 조립체의 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. 지금까지, 생물학적 활성 펩티드가 생물활성을 유지하면서 초분자 펩티드 나노구조에 성공적으로 도입될 수 있음을 잘 입증한 수많은 연구가 문헌에 있었다. 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.

[0009] 생물학적 치료제에 대한 모노클로날 항체의 수요가 증가함에 따라 약학 산업에서 고 친화성 항체-결합 입자 및 재료에 대한 관심이 급속하게 증가하고 있다. 널리 공지된 항체-결합 리간드인 단백질 A는 인간을 포함하는 대부분의 포유동물 종으로부터의 IgG의 Fc-부분에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 그러나, 단백질 A의 큰 크기는 이의 산업적 적용을 제한하고, 그에 따라 단백질 A의 다수의 합성 및 최소화된 도메인이 설계되고 연구되었다. 단백질 A의 Z-도메인은 59개의 아미노산 잔기 및 IgG1에 결합하는 경우 약 10 nM의 K_d 를 갖는 최초이자 가장 유명한 합성 도메인이다. 단백질 A의 Z-도메인을 추가로 최소화하기 위해, 결합 친화성($K_d = 43$ nM)을 유의하게 변화시키지 않으면서 2-나선 유도체 Z33이 설계되었다. 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. 최근에서야 친화성 침전이 비교적 간단한 공정을 이용하여 효과적인 정제 및 잠재적으로 비병목적인 배치 처리량을 제공함으로써 전통적인 크로마토그래피 방법에 대한 매력적인 대안이 되었다.

[0010] 친화성 침전의 전형적인 예는 엘라스틴-유사-단백질(ELP)의 온도 및 염 유발 용해도 전이를 통해 IgG를 침전시키기 위한 ELP 융합 Z-도메인의 사용이다. 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.

[0011] 자가-조립 양친매성 펩티드의 정밀한 분자 설계에 의해 영감을 받아, 본 발명자는 자가-조립 면역-양친매성 분자(immuno-amphiphile; IA) 내로 단백질 A 모방 펩티드 Z33을 통합시키는 방법을 이전에 기술하였고, 자가-조립

된 상태에서 표적 항체에 대한 이의 결합 능력을 조사하였다. 자가-조립된 면역섬유(IF)와 치료용 IgG 사이의 결합 친화성을 등은 적정 열량측정법(ITC)을 이용하여 조사하였고, 이는 Z33 함유 IF가 이의 높은 IgG 결합 친화성을 유지함을 암시한다.

[0012] 본 발명자는 펩티드가 단편화되고 알킬 사슬에 컨쥬게이션되어 단편화된 펩티드의 입체형태 구조를 변화시키고 효과적인 단백질 정제를 위해 조합될 수 있는 자가-조립 면역-양친매성을 여전히 유지하는지 여부를 조사하였다.

발명의 내용

[0013] 발명의 개요

[0014] 많은 일차원(1D) 나노구조는 생성된 조립체의 방향성 비등방성 성장을 촉진하는 분자간 수소 결합에 필수적인 코어 빌딩 모티프로써 짧은 β -시트 서열을 함유하는 펩티드 또는 펩티드 컨쥬게이트의 자가-조립에 의해 작제된다. 이러한 분자 설계 전략은 세포와 상호작용하기 위한 과다의 생물활성 필라멘트 β -시트 조립체의 성공적인 생산을 가져왔으나, 아밀로이드 원섬유를 연상시키는 잠재적 독성과 관련된 우려가 α -나선 펩티드를 갖는 다른 초분자 제작 전략을 촉진시켰다.

[0015] 본 발명자는 2개의 α -나선을 함유하는 모티프인 아미노산 서열 FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 1)을 갖는 단백질 A 모방 펩티드 Z33의 선형 탄화수소로의 직접 컨쥬게이션이 자가-조립 면역-양친매성 분자를 생성하였음을 이전에 보여주었고(2017년 3월 30일에 출원된 U.S. 특허 출원 번호 62/478,795호) 이는 그 전문에 기재되는 것처럼 참조로서 본원에 포함된다. 상기 결과는 결과로서 발생한 양친매성 펩티드가 필수적인 β -시트 세그먼트의 결핍에도 불구하고 이의 천연 α -나선 입체형태를 보존하면서 생리학적 조건 하에서 초분자 면역섬유(IF)로 효과적으로 회합할 수 있음을 제시한다. 등은 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 않았음을 확인하였다.

[0016] 본 발명은 단일-사슬 또는 이중-사슬 알킬화에 의해 α -나선과 β -시트 사이에서 α -나선 펩티드의 이차 구조를 전환시키는 분자 전략을 제공한다. 단백질 A로부터 유래된 α -나선 펩티드 Z33으로부터 분리된 2개의 펩티드 서열 단편은 면역-양친매성 분자(IA)에서 친수성 세그먼트로서 기능하도록 설계되었다. 이러한 자가-조립 면역섬유는 용액에서 조합될 때, pH 7.4에서 높은 특이성으로 면역글로불린 G(IgG) 항체에 결합할 수 있을 것으로 예상된다.

[0017] 따라서, 일부 구현예에서, 자가-조립 면역섬유로의 단백질 결합 펩티드의 초분자 공학은 효과적인 단백질 정제에 유용하다.

[0018] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공한다.

[0019] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α -나선 입체형태를 갖는다.

[0020] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.

[0021] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공한다.

[0022] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α -나선 입체형태를 갖는다.

[0023] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 β -시트 입체형태를 갖는다.

- [0024] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열의 부분을 갖는다.
- [0025] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 면역섬유 조성물을 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.
- [0026] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 하나 이상의 관심 단백질을 함유하는 제1 pH 수준의 용액을 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 면역섬유 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는 단계; 하나 이상의 관심 단백질이 항체 결합 펩티드 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체에 결합하도록 하는 단계; 용액의 pH 수준을 항체 결합 펩티드 및 하나 이상의 관심 단백질의 전하 특성 및 입체형태를 변화시키는 pH로 변화시키는 단계; 및 용액으로부터 방출된 하나 이상의 관심 단백질을 추출하는 단계를 포함하는 단백질의 정제를 위한 방법을 제공한다.
- [0027] 추가의 구현예에 따르면, 본 발명은 N-말단에서 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션되고, C-말단에서 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는 항체 결합 펩티드에 컨쥬게이션된 제1 스페이스 펩티드에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역섬유 결합 분자, 및 추가로 XXBB의 일반 서열(여기서 XX는 작은 소수성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, BB는 음으로 하전된 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있다)을 포함하는 펩티드 서열에 컨쥬게이션된 선형 탄화수소 사슬을 N-말단에 갖는 면역섬유 스페이스 분자를 포함하는 면역섬유 조성물을 제공하며, 여기서 상기 제1 스페이스 펩티드는 XXYYZZ의 일반 서열(여기서 XX는 작은 소수성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, YY는 양으로 하전된 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, ZZ는 작은 중성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있다)을 포함한다.
- [0028] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 면역섬유 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도면의 간단한 설명

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

도 3A-3D. (3A) PBS 완충액, pH 7.4, 및 (3B) IgG 용리 완충액, pH 2.8에서 15°C에서 2 μ M IgG1의 용액으로 100 μ M C12-Z33의 적정을 위한 ITC 프로파일. 15°C, pH 7.4에서 PBS 중 2 μ M IgG1으로 100 μ M (3C) Z33 및 (3D) C12-SZ33의 적정을 위한 ITC 프로파일.

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

도 5A-5D. (5A) 0.6 M Na₂SO₄ 용액에 의해 촉발된 IF-IgG 복합체의 침전의 개략도. (5B) 0.6 M Na₂SO₄의 첨가 전 (i) 및 후(ii)의 C12-Z33의 5 mM PBS 용액 및 (iii) 5 mM C12-Z33, (iv) 0.6 M Na₂SO₄, 및 (v) 5 mM C12-Z33 및 0.6 M Na₂SO₄를 갖는 IgG1의 20 μM PBS 용액의 사진. 침전이 (ii) 및 (v)에서 관찰되었다. (5C) 0.6 M Na₂SO₄의 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. (5D) 0.6 M Na₂SO₄의 첨가 전 및 후의 2 mM C12-SZ33 및 IgG1+C12-SZ33 복합체의 흡광도 스펙트럼.

도 6A-6B. (6A) 각각 C16 및 2C8에 의한 직접 알킬화를 통한 나선1- 및 나선2-기반 펩티드 양친매성 분자의 예시적인 구현예의 설계의 개략도. (6B) 일차원 나노구조로의 IA 분자의 자가-조립의 개략도.

도 7A-7B. 다른 IA의 TEM 이미지. (7A) 나선1-C16 및 (7C) C16-나선2의 TEM 이미지는 각각 직경이 9.5 ± 1.2 nm 및 12.4 ± 1.7 nm인 나노섬유 형태를 나타낸다. (7B) 나선1-2C8 및 (7D) 2C8-나선2의 TEM 이미지는 각각 직경이 10-70 nm 및 22.9 ± 1.5 nm인 나노벨트 형태를 나타낸다. 모든 샘플을 1 mM, pH 7.4의 물에서 제조하고 영상화 전에 밤새 에이징시켰다. TEM 샘플은 2 wt% 우라닐 아세테이트로 음성 염색되었다. 눈금 바: 200 nm.

도 8A-8D. 임계 마이셀 농도(CMC) 값을 결정하기 위한 (8A) 나선1-C16, (8B) C16-나선2, (8C) 나선1-2C8, 및 (8D) 2C8-나선2와 함께 인큐베이션될 때 리포터 염료 나일 레드(Nile Red)의 방출 스펙트럼. 여기에 표시된 모든 스펙트럼은 방출 최대에 의해 표준화되며, 컨쥬게이트 농도가 CMC를 초과할 때 청색-이동이 표시된다. 각 IA의 CMC 범위는 범례의 박스 안에 표시되어 있다. 단위: μM.

도 9A-9B. pH 7.4의 물 중에서 100 μM (9A) 나선1, 나선1-C16, 나선1-2C8, 및 (9B) 나선2, C16-나선2, 2C8-나선2의 표준화된 CD 스펙트럼.

도 10A-10B. pH 7.4의 물 중에서 상이한 농도의 (10A) 나선1-2C8 및 (10B) 나선1-C16의 표준화된 CD 스펙트럼. 농도의 단위는 μM이다.

도 11A-11F. 다른 IA의 TEM 이미지. (11A) 나선1-C12 및 (11B) C12-나선2의 TEM 이미지는 각각 직경이 12.9 ± 0.9 nm 및 13.9 ± 1.5 nm인 나노섬유 형태를 나타낸다. 눈금 바: 200 nm. 임계 마이셀 농도(CMC) 값을 결정하기 위한 (11C) 나선1-C12 및 (11D) C12-나선2와 함께 인큐베이션될 때 리포터 염료 나일 레드의 방출 스펙트럼. 농도의 단위는 μM이다. PH 7.4의 물 중에서 100 μM (11E) 나선1, 나선1-C8, 나선1-C12 및 (11F) 나선2, C8-나선2, C16-나선2의 표준화된 CD 스펙트럼.

도 12. 나선1, 나선2, 및 Z33의 항체 결합 펩티드 서열의 단편의 일부 예시적인 구현예의 화학 구조.

도 13. 나선1-C8, 나선1-C12, 나선1-C16, 및 나선1-2C8의 항체 결합 펩티드 서열의 일부 예시적인 단편의 화학 구조.

도 14. C8-나선2, C12-나선2, C16-나선2, 및 2C8-나선2의 일부 예시적인 항체 결합 펩티드 서열의 단편의 화학 구조.

도 15A-15B. 임계 마이셀 농도(CMC) 값을 결정하기 위한 (15A) 나선1-C8, (15B) C8-나선2와 함께 인큐베이션될 때 리포터 염료 나일 레드의 방출 스펙트럼. 여기에 제시된 모든 스펙트럼은 방출 최대에 의해 표준화된다. 농도의 단위는 μM이다. 컨쥬게이트 농도가 100 μM에 도달하더라도 검출 가능한 피크 이동은 관찰되지 않았다.

도 16. PH 7.4의 물 중에서 100 μM의 나선1, 나선2, 및 Z33의 표준화된 CD 스펙트럼.

도 17. 나선1 및 나선2 기반 IA의 CD 스펙트럼의 분석. (A) 나선1-기반 및 (B) 나선2-기반 분자에서 3개의 주요 이차 구조의 함량. CD 데이터는 대략적인 α-나선, β-시트, 및 무작위 코일 펩티드 이차 구조를 결정하기 위해 폴리리신 기초 스펙트럼의 선형 조합을 사용하여 200 내지 240 nm로 맞추었다.

도 18. 탈이온수에서 100 μM의 나선1 및 나선1-기반 펩티드 양친매성 분자에 의한 ThT 염료의 형광.

도 19. (19A) 대안적인 구현예의 결합 분자 C12-VVKKGGZ33 및 스페이서 분자 C12-VVEE의 화학 구조. 알킬 꼬리(오렌지)를 펩티드 서열의 N-말단에 컨쥬게이션시켰다. 2개의 발린(VV, 적색)은 일차원 구조의 형성을 촉진한다. 스페이서 분자에서 2개의 글루탐산(EЕ, 청색)이 친수성 세그먼트로 설계되고, 2개의 리신(KK, 청색)이 이에 따라 KK와 EЕ 사이의 정전기적 상호작용을 위해 설계되어, 결합 및 스페이서 분자의 교대 패키징을 유도하였다. 2개의 글리신(GG, 녹색)은 알킬 사슬로부터 Z33을 추가로 분리하기 위해 설계되었다. (B) C12-

VVKKGGZ33 및 C12-VVEE의 공동-조립의 개략도. 공동-조립된 면역섬유의 표면 상의 결합 분자의 밀도는 결합 및 스페이서 분자의 물비를 조정함으로써 용이하게 제어될 수 있다.

도 20. (20A) 자가-조립된 C12-VVEE, (20B) 자가-조립된 C12-VVKKGGZ33의 대표적인 TEM 이미지.

도 21. IgG 결합 및 침전 수율. (21A) 5:1, 10:1, 25:1, 50:1, 및 100:1 물비의 C12-VVEE 및 C12-VVKKGGZ33과 함께 인큐베이션 및 1 M 암모늄 설페이트의 후속 첨가 후 20 μ M IgG의 상층액에서의 IgG 백분율. C12-VVKKGGZ33 및 IgG의 물비: 10:2 (21B) 25:1 및 50:1 물비의 C12-VVEE 및 C12-VVKKGGZ33와 함께 인큐베이션 및 1 M 암모늄 설페이트의 후속 첨가 후 20, 10, 및 5 μ M IgG의 상층액에서의 IgG 백분율. C12-VVKKGGZ33 및 IgG의 물비는 10:4, 10:2, 및 10:1이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

발명의 상세한 설명

[0031]

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 도메인은 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 개발되었다.

[0032]

여러 구현예에 따르면, 본 발명은 IF에 대한 빌딩 유닛으로 작용하는 면역-양친매성 분자로의 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 IF가 생리학적 pH 범위의 수용액에서 형성되면, 표면 상에 제시된 노출된 생물활성 에피토프(결합 부위)는 IgG에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0033]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공한다.

[0034]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α -나선 입체형태를 갖는다.

[0035]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0036]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 아미노산 서열 FNMQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 1), 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0037]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공한다.

[0038]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 α -나선 입체형태를 갖는다.

[0039]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 면역-양친매성 분자는 생리학적 pH의 수용액에 존재하는 경우 β -시트 입체형태를 갖는다.

[0040]

일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 자가-조립 면역섬유를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스

스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열의 부분을 갖는다.

- [0041] 본원에서 사용되는 용어 "항체 결합 펩티드의 단편"은 SEQ ID NO: 1의 33개 미만의 아미노산을 갖는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 부분 또는 단편을 의미한다. 일부 구현예에서, 용어 "항체 결합 펩티드의 단편"은 펩티드 내에 적어도 하나의 α -나선 영역을 갖는 펩티드를 포함하는 Z33 펩티드의 부분을 의미한다. 항체 결합 펩티드의 단편은 또한 α -나선 영역을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 추가 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0042] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드의 단편은 FNMQQRRFYALHD(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 서열을 포함하고 나선 1로서 지칭된다. 일부 구현예에서, 나선 1은 FNMQQRRFYALHDK(SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 나선 1은 FNMQQRRFYALHDKK(SEQ ID NO: 4)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드의 단편을 포함하는 면역-양친매성 분자를 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드의 단편은 PNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 5)의 아미노산 서열을 포함하고 나선 2로서 지칭된다. 일부 구현예에서, 나선 2는 FPNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 6)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0044] 본원에서 사용되는 용어 "면역-양친매성 분자"는 "면역섬유"(IF)로 명명된 불연속의 안정적인 초분자 나노구조로 자발적으로 회합할 수 있는 분자를 의미한다. 일반적으로, 본 발명의 IF는 약 2.8 내지 약 7.5의 pH 범위에서 조립될 수 있다. 그러나, 결합 특성은 또한 pH 의존적이다. 더욱 양으로 하전되는 이들 IF는 더 높은 pH의 용액과 회합하기 용이하며, 반대로 음으로 하전된 IF는 더 낮은 pH의 용액에서 더 용이하게 회합할 것이다.
- [0045] 일부 구현예에서, 본 발명의 면역-양친매성 분자는 8 내지 22개의 탄소를 갖는 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 친수성 펩티드를 포함하며, 상기 사슬은 선형이거나 분지형일 수 있다. 수용액에서의 용해도의 관점에서 탄소의 수에는 상한이 있다. 친수성 펩티드는 나노구조의 수 용해도를 증가시키고, 바람직한 이차 구조 형성, 예를 들어, 베타 시트, 알파 나선, 폴리 프로필린 타입-II 나선, 베타 턴을 통해 원통형 또는 구형 마이셀, 중공 나노튜브, 토로이드, 디스크 및 소포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 잘 규정된 나노구조 구조물의 형성을 촉진할 수 있다.
- [0046] 본원에서 사용되는 용어 "탄화수소 사슬"은 용어 "지방족 사슬"과 동의어이고, 이는 당 분야에서 인식되는 용어이며 선형, 분지형, 및 사이클릭 알칸, 알켄 또는 알킨을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 지방족 기는 선형 또는 분지형이고 8 내지 약 22개의 탄소 원자를 갖는다.
- [0047] 용어 "알킬"은 당 분야에서 인식되며, 본원에서의 사용은 직쇄 알킬기 및 분지쇄 알킬기를 포함하는 포화된 지방족기를 포함한다.
- [0048] 본원에서 사용되는 용어 "항체 결합 펩티드"는 약 10^{-6} M 내지 약 10^{-10} M의 K_d 를 갖는 것과 같이 높은 특이성으로 항체, 또는 항체 분자의 특정 부분, 예를 들어, Fc 부분에 결합하는 능력을 갖는 펩티드를 의미한다.
- [0049] 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.
- [0050] 본원에서 사용되는 단백질 A의 Z33 펩티드는 FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0051] 일부 구현예에서, 항체 결합 펩티드는 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 단백질 A의 Z33 펩티드의 단편이며, 상기 항체 결합 펩티드의 단편은 FNMQQRRFYALHD(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 서열을 포함하고 나선 1로 지칭된다. 일부 구현예에서, 나선 1은 FNMQQRRFYALHDK(SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 나선 1은 FNMQQRRFYALHDKK(SEQ ID NO: 4)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0052] 일부 구현예에서, 항체 결합 펩티드는 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 단백질 A의 Z33 펩티드의 단편이며, 상기 항체 결합 펩티드는 PNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 5)의 아미노산 서열을 포함하고 나선 2로서 지칭된다. 일부 구현예에서, 나선 2는 FPNLNEEQRNAIKSIRDD(SEQ ID NO: 6)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0053] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 선형 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 면역섬유 조성물을 제공하며, 상기 항체 결합 펩티드는 스태필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를

갖는다. 일부 구현예에서, 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체는 SEQ ID NO: 1-6으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0054] 당업자는 다른 결합 펩티드가 다른 단백질에 결합하기 위해 Z33 펩티드를 대신할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 스트렙타비딘 또는 이의 기능성 부분 또는 단편은 면역-양친매성 분자에 혼입될 수 있고, 생성된 IF는 비오틴화된 화합물에 결합하는데 사용될 수 있다.

[0055] 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 인코딩된 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.

[0056] "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 펩 또는 동일 속 또는 과의 펩으로부터의 독으로부터의 기능적, 구조적 또는 입체화학적으로 유사한 펩티드를 포함한다. 모든 상기 동족체가 본 발명에 의해 고려된다.

[0057] 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.

[0058] 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.

[0059] 표 1: 비-천연 아미노산

비-천통적		비-천통적	
아미노산	코드	아미노산	코드
α-아미노부티르산	Abu	L-N-메틸알라닌	Nmala
α-아미노-α-메틸부티레이트	Mgab	L-N-메틸아르기닌	Nmarg
아미노사이클로프로판-	Cpro	L-N-메틸아스파라긴	Nmasn
카르복실레이트		L-N-메틸아스파르트산	Nmasp
아미노이소부티르산	Aib	L-N-메틸시스테인	Nmcys
아미노노르보일-	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-L-부틸글리신	Nmtbug

[0060]

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	Mgab
D- α -메틸알라닌	Dmala	α -메틸사이클로헥실알라닌	Mchexa
D- α -메틸아르기닌	Dmarg	α -메틸사이클로헥실알라닌	Mcpen
D- α -메틸아스파라긴	Dmasn	α -메틸- α -나프틸알라닌	Manap
D- α -메틸아스파테이트	Dmasp	α -메틸페닐알라닌	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-카르바미에틸)글리신	Ngln
D- α -메틸오르니틴	Dmorn	N-(카르바미에틸)글리신	Nasn
D- α -메틸페닐알라닌	Dmphe	N-(2-카르복시에틸)글리신	Nglu
D- α -메틸프롤린	Dmpro	N-(카르복시에틸)글리신	Nasp
D- α -메틸세린	Dmser	N-사이클로부틸글리신	Ncbut
D- α -메틸트레오닌	Dmthr	N-사이클로헥실글리신	Nchep
D- α -메틸트립토판	Dmtrp	N-사이클로헥실글리신	Nchex
D- α -메틸티로신	Dmtty	N-사이클로데실글리신	Ncdec
D- α -메틸발린	Dmval	N-사이클로데실글리신	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

[0061]

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-(ρ -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

[0062]

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- 에틸아미노)사이클로프로판	Nmbc		

[0063]

[0064]

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 구조를 부과하는 가교제 및 다른 방법의 이
용을 포함한다.

[0065]

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 설펜산(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.

- [0066] 아르기닌 잔기의 구아니딘기는 2,3-부탄디온, 페닐글리옥살 및 글리옥살과 같은 시약을 이용한 헤테로사이클릭 축합 생성물의 형성에 의해 변형될 수 있다.
- [0067] 카르복실기는 0-아실이소우레아 형성을 통한 카르보다이미드 활성화 후, 예를 들어, 상응하는 아미드로의 후속 유도체화에 의해 변형될 수 있다.
- [0068] 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.
- [0069] 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.
- [0070] 히스티딘 잔기의 이미다졸 고리의 변형은 요오도아세트산 유도체를 이용한 알킬화 또는 디에틸피로카르보네이트를 이용한 N-카르브에톡실화에 의해 달성될 수 있다.
- [0071] $n=1$ 내지 $n=6$ 인 $(\text{CH}_2)_n$ 스페이서 기를 갖는 이기능성 이미도 에스테르, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르와 같은 동중-이기능성 가교제, 및 N-하이드록시숙신이미드와 같은 아미노-반응성 모이어티 및 또 다른 기 특이적-반응성 모이어티, 예를 들어, 말레이미드 또는 디티오 모이어티(SH) 또는 카르보다이미드(COOH)를 일반적으로 함유하는 이중-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_α 와 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.
- [0072] 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 아미드 결합에 의해 연결된다.
- [0073] 일부 구현예에 따르면, 일반적으로, 본 발명은 관심 단백질 또는 펩티드의 정제를 위한 방법을 제공하며, 상기 단백질 또는 펩티드는 본 발명의 면역섭유에 의한 면역집진 방법을 사용하여 면역섭유의 항체 결합 펩티드 부분에 의해 결합될 수 있다.
- [0074] 일 구현예에 따르면, 본 발명은 면역글로불린 분자의 Fc 부분 또는 이의 기능성 부분 또는 단편을 갖는 펩티드 또는 단백질의 정제를 위한 방법을 제공하며, 이는 하나 이상의 관심 펩티드 또는 단백질을 함유하는 제1 pH 수준의 용액을 하나 이상의 면역-양친매성 분자를 포함하는 면역섭유 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 하나 이상의 면역-양친매성 분자가 탄화수소 사슬에 컨쥬게이션된 Fc 결합 펩티드를 포함하고, 상기 Fc 결합 펩티드가 스테필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 포함하는 단계; 하나 이상의 관심 단백질이 Fc 결합 펩티드 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체에 결합하도록 하는 단계; 용액의 pH 수준을 Fc 결합 펩티드의 입체형태를 하나 이상의 관심있는 펩티드에 더 이상 결합하지 않는 입체형태로 변화시키는 pH로 변화시키는 단계; 및 용액으로부터 방출된 하나 이상의 관심 단백질을 추출하는 단계를 포함한다.
- [0075] 일반적으로, Fc 함유 단백질은 면역글로불린 또는 항체(예를 들어, IgG 유형)이거나 Fc 부분을 함유하는 융합 펩티드 또는 단백질일 수 있으며, 샘플 중의 단백질을 수용액 및 생리학적 pH에서 본 발명의 면역섭유와 혼합하여, 면역섭유가 관심 단백질 분자의 Fc 부분에 결합하게 함으로써 정제된다. 일부 구현예에서, 면역섭유는 단백질 A의 Z33 부분을 포함하고, IgG 분자의 Fc 부분 또는 이를 포함하는 융합 펩티드 또는 단백질에 특이적이다.
- [0076] 일부 다른 구현예에 따르면, 이후 면역섭유는 다양한 여과 방법, 예를 들어, 이를 테면, 정용여과, 미세여과 또는 초미세여과를 사용하여 결합 단백질로부터 분리된다.
- [0077] 일 구현예에서, 본 발명의 면역섭유 조성물은 선형 탄화수소에 컨쥬게이션된 단백질 A의 Z33 펩티드의 2개 이상

의 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 항체의 정제 또는 결합 방법에 사용되는 면역섬유는 나선 1 및 나선 2 펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 SEQ ID NO: 2-4의 펩티드 서열 및 이들의 조합을 갖는 하나 이상의 나선 1 펩티드의 첨가, 및 SEQ ID NO: 5 또는 6의 펩티드 서열 및 이들의 조합을 갖는 하나 이상의 나선 2 펩티드의 첨가를 포함할 수 있다.

[0078] 면역섬유가 결합하도록 하는 기간 후, 면역섬유는 용액에서 면역섬유-단백질 복합체를 형성한다. 이후, 형성된 복합체는, 예를 들어, 염-유도 침전 및 원심분리를 포함하는 많은 공지된 분리 수단에 의해 결합되지 않은 섬유 및 샘플 내의 단백질 및 다른 성분으로부터 분리될 수 있다. 이후, 분리된 복합체는 산성 pH에서 또 다른 용액으로 도입될 수 있으며, 여기서 면역섬유는 단백질에 대한 이의 결합 친화성을 상실한다. 이후, 단백질은 여과, 예를 들어, 정용여과 또는 다른 수단에 의해 해리된 면역섬유로부터 분리될 수 있고, 해리된 단백질도 또한 제거될 수 있다.

[0079] 본 발명의 면역섬유는 다른 단백질 정제 방법, 예를 들어, 다공성 수지(예를 들어, 비드화된 아가로스) 또는 자성 비드에 이들을 공유적으로 고정시키거나, 또는 고정화된 기질 및 면역침전 방법의 조합과 같은 다른 단백질 정제 방법에 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 본 발명의 면역섬유를 사용하여 결합될 수 있는 관심 항체를 함유하는 임의의 샘플 또는 용액 또는 유체를 의미한다. 일부 구현예에서, 샘플은 생물학적 샘플일 수 있다.

[0081] 본 발명의 하나 이상의 구현예에 따르면, 용어 "생물학적 샘플" 또는 "생물학적 유체"는 살아 있거나 이전에 살아 있던 환자 또는 포유동물로부터의 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, 및 피부를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0082] 이 연구에서 IA의 모든 서열, CMC, 및 이차 구조는 표 1에 요약되어 있다. 긴 단일-사슬 및 이중-사슬 알킬화 둘 모두는 일차원 필라멘트를 형성할 수 있지만, 형태, CMC, 및 이차 구조가 상이하다. 알킬 사슬의 길이 및 수는 펩티드 컨주게이트의 자가-조립 거동에 영향을 미치는 것으로 입증되었다. 예를 들어, Jan van Hest 및 동료들은 C12 또는 더 짧은 알킬 사슬과 컨주게이션된 GANPNAAG(SEQ ID NO: 8) 펩티드가 응집체를 나타내지 않았음을 발견하였다. 그러나, 섬유성 응집체 및 관형 구조는 각각 C14 컨주게이트 및 C16 이상의 컨주게이트에서 발견되었다. 유사하게, 이전에 다른 연구자들에 의해 보고된 바와 같이, 단일-사슬 알킬화된 양친매성 분자의 CMC는 IA의 응집을 촉진하는 강화된 소수성으로 인해 알킬 사슬의 길이가 증가함에 따라 감소한다. 알킬 사슬 컨주게이션은 이전에 α -나선 이차 구조의 안정성을 향상시키고 컨주게이션된 형태의 함량을 증가시키는 것으로 입증되었다. 펩티드를 형성하기 위한 일부 α -나선에서 향상된 생물활성이 보고되었다. 예를 들어, SC4 펩티드-양친매성 분자에 대한 살균 활성의 증가는 Mayo 및 Tirell에 의해 발견되었다. 본 발명자의 결과는 알킬 사슬이 연장됨에 따라 16-잔기 펩티드의 나선성이 증가하는 Fornis 및 동료들이 조사한 시스템과 충돌하는 것으로 보인다. 그러나, 이러한 불일치는 컨주게이션되지 않은 16-잔기 펩티드에서 기존의 α -나선 구조에 의해 야기될 수 있다. Mihara 및 동료들은 더 긴 N-말단 알킬화된 2 α -나선 펩티드가 더 높은 비율의 α -에서- β 전이를 겪었음을 발견하였는데, 이는 β -시트의 형성이 긴 알킬 사슬에 의해 촉진되었음을 나타낸다.

[0083] 결론적으로, 두 시리즈의 면역-양친매성 분자가 성공적으로 설계되고 합성되었다. IA의 상이한 분자 설계를 통해, 상이한 알킬화 방법으로 IA 분자가 CMC 값, 형태, 및 이차 구조의 성분과 같은 몇몇 자가-조립 특성을 변화시키는 것이 밝혀졌다. 본 발명자의 결과는 단일-사슬 및 이중-사슬 알킬화 둘 모두가 일차원 필라멘트의 형성으로 이어질 수 있음을 명확하게 보여준다. 더 긴 단일 알킬 사슬은 IA 분자의 응집을 촉진하고 β -시트의 형성을 증가시킬 수 있었다. 이중-사슬 알킬화는 자가-조립된 필라멘트에서 α -나선의 형성을 도울 수 있다. 그러나, 상이한 펩티드 분자간에 알킬화의 영향에는 차이가 있다. 알킬 사슬의 길이 및 수를 조정하는 이러한 전략은 요망되는 생물활성을 발휘하기 위해 특정 이차 구조를 필요로 하는 다른 자가-조립된 기능성 펩티드 시스템에서 추가로 개발되고 적용될 수 있다.

[0084] 일부 구현예에 따르면, 펩티드 및 이의 단편을 알킬화하는데 사용되는 알킬 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 및 24개 탄소 길이의 중간 길이를 포함하는, 길이가 2 내지 24개 탄소인 탄소 길이를 가질 수 있다. 또한, 펩티드 또는 이의 단편은 펩티드 또는 이의 단편에 알킬화된 1 내지 4개의 알킬 사슬을 가질 수 있다.

[0085] 본 발명의 면역섬유 조성물의 대안적인 구현예.

[0086] 본 발명자의 이전 연구는 자가-조립 C12-Z33 면역섬유의 높은 IgG 결합 친화성 및 잠재적 IgG 침전 능력을 보여주었다. 면역섬유에서 C12-Z33의 밀착 패키징을 고려하면, 상기 기재된 제1 면역섬유 설계의 단점은 직경이 10 nm

인 IgG 분자에 대해 Z33 리간드의 리간드 접근성이 제한될 수 있다는 점이다. 비록 고 밀도의 Z33 리간드가 면역섬유의 표면에 제공되지만, 입체 장애는 IgG 결합 효율 및 면역섬유의 가교를 방지하여 침전을 위한 큰 조립체를 형성할 수 있다고 생각되었다. 이와 같이, 본 발명의 면역섬유 조성물의 대안적인 구현예가 제공된다.

[0087] 하나 이상의 구현예에 따르면, 결합 분자(알킬-XXYYZZ-항체 결합 펩티드) 및 스페이서 분자(알킬-XXBB)(여기서 제1 스페이서 분자는 XXYYZZ의 일반 서열을 포함하고, 여기서 XX는 작은 소수성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, YY는 양으로 하전된 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, ZZ는 작은 중성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있다)를 공동-조립된 면역섬유 시스템에서 조합시키고, XXBB의 일반 서열을 포함하는 펩티드 서열(여기서 XX는 작은 소수성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, BB는 음으로 하전된 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있다)에 컨주게이션된 선형 탄화수소 사슬을 N-말단에 갖는 면역섬유 스페이서 분자를 추가로 포함함에 의해 개선된 면역섬유 결합 시스템이 제공된다.

[0088] 예시적인 구현예에서, 면역섬유 결합 분자는 4-8개의 아미노산을 함유하고, 일부 구현예에서, 상기 제공된 C12-Z33과 비교하여 탄소 사슬과 항체 결합 펩티드 Z33 사이에 VVKGG(SEQ ID NO: 9)를 포함하는 6개의 아미노산 잔기를 함유한다. 발린(VV, 적색)과 같은 2개의 소수성 아미노산은 일차원 구조의 형성을 촉진한다. 스페이서 분자에서 2개의 양으로 하전된 아미노산, 예를 들어, 글루탐산(EE, 청색)은 친수성 세그먼트로 설계되고, 이에 따라 2개의 음으로 하전된 아미노산, 예를 들어, 리신(KK, 청색)은 양으로 하전된 아미노산과 음으로 하전된 아미노산 사이의 정전기적 상호작용을 위해 설계되어, 결합 및 스페이서 면역섬유 분자 C12-VVKGGZ33의 교대 패키징을 유도하였다. 글리신(GG, 녹색)과 같은 2개의 중성 아미노산은 알킬 사슬로부터 Z33과 같은 항체 결합 펩티드를 추가로 분리하기 위해 설계되었다. 결합 및 스페이서 분자를 수용액에 용해시킬 때, 이들 두 분자는 표면에서 빠져 나온 결합 리간드 Z33에 의해 일차원 면역섬유로 균일하게 공동-조립될 수 있을 것으로 예상되었다(도 19).

[0089] 추가의 구현예에 따르면, 본 발명은 N-말단에서 선형 탄화수소 사슬에 컨주게이션되고, C-말단에서 스테필로코커스 아우레우스의 단백질 A의 Z33 펩티드의 친수성 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 부분 또는 단편 또는 유도체를 갖는 항체 결합 펩티드에 컨주게이션된 제1 스페이서 펩티드에 컨주게이션된 항체 결합 펩티드를 포함하는 면역섬유 결합 분자, 및 추가로 XXBB의 일반 서열(여기서 XX는 작은 소수성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, BB는 음으로 하전된 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있다)을 포함하는 펩티드 서열에 컨주게이션된 선형 탄화수소 사슬을 N-말단에 갖는 면역섬유 스페이서 분자를 포함하는 면역섬유 조성물을 제공하며, 여기서 상기 제1 스페이서 펩티드는 XXYYZZ의 일반 서열(여기서 XX는 작은 소수성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, YY는 양으로 하전된 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있으며, ZZ는 작은 중성 측쇄를 갖는 2개의 아미노산이고 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있다)을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 서열 VVEE((SEQ ID NO: 10)는 면역섬유 스페이서 펩티드로서 C12-VVEE를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0090] 당업자는 "소수성 측쇄를 갖는 아미노산"이라는 용어가 Ala, Val, Ile, Leu와 같은 아미노산을 의미한다는 것을 이해할 것이다. 용어 "양으로 하전된 측쇄를 갖는 아미노산"은 Arg, His 및 Lys를 의미한다. "작은 중성 측쇄를 갖는 아미노산"이라는 용어는 Gly 또는 Pro와 같은 아미노산을 의미한다. 용어 "음으로 하전된 측쇄를 갖는 아미노산"은 Asp 또는 Glu와 같은 아미노산을 의미한다.

[0091] 본 발명의 면역섬유 결합 분자(알킬-XXYYZZ-항체 결합 펩티드) 및 스페이서 분자(알킬-XXBB)를 포함하는 면역섬유 조성물 및 대안적인 면역섬유 결합 시스템은 항체 및 항체의 Fc 부분을 포함하는 다른 분자 또는 이의 일부 또는 단편을 정제하는데 유용하다. 일부 구현예에서, 본 발명의 면역섬유 조성물은 항체 분자의 Fc의 적어도 일부를 포함하는 임의의 펩티드 또는 융합 단백질을 분리 또는 정제하는데 사용될 수 있다.

[0092] 정제된 단백질에서 마지막 불순물 흔적을 제거하는 것을 일반적으로 연마라고 한다. 연구, 진단 및 보다 중요한 치료적 응용을 위해 의도될 때 단백질 불순물이 바람직하지 않은 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 이는 하류 공정에서 중요한 단계이다. 연마는 일반적으로 이전 단계에 대한 직교 분리 방법을 사용하여 달성되며, 가장 일반적인 것은 겔 투과 크로마토그래피이다. 연마 효과에도 불구하고, 이 기술은 저속으로 인해 분리 능력이 불충분하고 생산성이 낮다. 주어진 공정에 대해 최적화될 수 있는, 예를 들어, 음이온 교환 또는 소수성 크로마토그래피에 기반한 다른 접근법은 일반적인 방법으로 사용될 수 없다. 일부 구현예에서, 관심 단백질을 정제하기 위해 추가의 연마 단계가 사용될 것이다.

[0093] 따라서, 전술한 관점에서, 본 발명은 a) 상기 기재된 임의의 면역섬유 조성물을 함유하는 샘플을 수용액 및 생

리학적 pH에 용해시키고 IF로 자가-조립되도록 이를 밤새 에이징시키는 단계 ; b) 항체를 함유하는 샘플을 IF 용액과 혼합하고, IF가 면역글로불린 분자의 Fc 부분 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질에 결합하도록 하여 용액 중에 면역섬유-Fc 면역글로불린 또는 면역섬유-Fc 함유 펩티드 또는 단백질 복합체를 형성하는 단계; c) 염 침가 및 원심분리에 의해 상기 용액으로부터 면역섬유-Fc 면역글로불린 또는 면역섬유-Fc 함유 펩티드 또는 단백질 복합체를 분리하는 단계; d) 면역글로불린 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질로부터 IF를 분리하고 결합되지 않은 면역글로불린 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질을 수집하는 단계를 포함하는 항체 또는 Fc 함유 펩티드 또는 단백질의 정제를 위한 방법을 제공한다.

[0094] 하기 실시예는 여기에 개시된 주제의 대표적인 구현예를 실시하기 위해 당업자에게 지침을 제공하기 위해 포함되었다. 본 개시내용 및 당업자의 일반적인 수준에 비추어, 당업자는 하기 실시예가 단지 예시적인 것으로 의도되고, 여기에 개시된 주제의 범위를 벗어나지 않으며 수많은 변경, 수정, 및 변경이 적용될 수 있음을 이해할 수 있다. 하기 합성 설명 및 특정 예는 단지 예시의 목적을 위한 것이며, 다른 방법에 의해 본 개시내용의 화합물을 제조하는 임의의 방식으로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0095] 실시예

[0096] 재료. 모든 Fmoc 아미노산 및 수지를 Advanced Automated Peptide Protein Technologies(AAPPTec, Louisville, KY, USA)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.

[0097] 분자 합성. C12-Z33 및 2C8-Z33 면역-양친매성 분자를 유사한 방법을 사용하여 합성하였다. 간단히, Z33 펩티드를 먼저 표준 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc) 고체상 합성 프로토콜을 이용하여 Focus XC 자동 펩티드 합성기(AAPPTec, Louisville, KY) 상에서 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. 다른 알킬 사슬을 펩티드의 N-말단 또는 리신(K)의 측쇄에서 수동으로 커플링시켜 상이한 IA를 생산하고, 실온에서 밤새 진탕시켰다. 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/H₂O의 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.

[0098] 항체 결합 펩티드의 단편을 갖는 IA의 분자 합성. 펩티드 양친매성 분자를 유사한 방법을 사용하여 합성하였다. 아래에서 본 발명자는 나선1-C16, 나선1-2C8, C16-나선2, 및 2C8-나선2를 예로 들어 합성 과정을 보여준다. 요약하면, FNMQQRRFYALHDK(나선1+Kmtt)(SEQ ID NO: 3) 및 FNMQQRRFYALHDKK(나선1+Kmtt+Kmtt)(SEQ ID NO: 4) 펩티드 서열을 Focus XC 자동 펩티드 합성기(AAPPTec, Louisville, KY) 상에서 표준 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc) 고체상 합성 프로토콜을 사용하여 먼저 합성하였다. K-메틸티오테트라졸(Kmtt)을 추가 반응을 위해 나선1 서열의 C-말단에서 첨가하였다. 이후, 팔미트산(C16) 또는 옥탄산(2C8) 알킬 꼬리를 각각 나선1+Kmtt 및 나선1+Kmtt+KmttKmtt의 Kmtt의 측쇄에서 수동으로 커플링하여 나선1-C16 및 나선1-2C8을 생성하고, 실온에서 밤새 진탕시켰다. 유사하게, C16-나선2, 및 2C8-나선2의 경우, PNLNEEQRNAIKSIRDD(나선2)(SEQ ID NO: 5) 및 FPNLNEEQRNAIKSIRDD(K-Fmoc-나선2)(SEQ ID NO: 6) 펩티드 서열을 Focus XC 자동 펩티드 합성기 상에서 먼저 합성하였다. 추가 반응을 위해 K-Fmoc를 나선2 서열의 N-말단에서 첨가하였다. 이후, 팔미트산(C16) 또는 옥탄산(2C8) 알킬 꼬리를 나선2의 N-말단 또는 K-Fmoc-나선2의 K-Fmoc의 N-말단 및 측쇄 둘 모두에 각각 수동으로 커플링하여 나선1-C16 및 나선1-2C8을 생성하고, 실온에서 밤새 진탕시켰다. 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)을 사용하여 시험되었다. 완성된 펩티드를 2.5시간 동안 92.5:5:2.5의 비의 TFA/TIS/H₂O의 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.

- [0099] IA를 분획 수집기가 장착된 Varian ProStar Model 325 분취용 HPLC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에서 25°C에서 Varian Polymeric Column(PLRP-S, 100Å, 10 μm, 150×25 mm)을 이용한 분취용 RP-HPLC에 의해 정제하였다. 0.1% v/v TFA를 함유하는 물/아세트니트릴 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°C 4.5 L 동결 건조기, Labconco, Kansas City, MO)시키고, -30°C에서 저장하였다.
- [0100] 면역-양친매성 분자의 자가-조립 및 TEM 영상화. 1 mM 농도를 갖는 면역-양친매성 분자를 HFIP로 전처리한 후, 1×PBS 또는 탈이온수에 용해시키고, 실온에서 밤새 에이징시켰다; 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.
- [0101] 원형 이색성 분광법(CD). 자가-조립된 IA 샘플의 CD 실험을 25°C에서 1 mm 경로 길이의 석영 UV-Vis 흡수 셀(ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 Jasco J-710 분광편광계(JASCO, Easton, MD, USA)에서 수행하였다. 샘플을 실험 전에 1 mM 스톱 용액으로부터 1×PBS 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.
- [0102] ITC 실험. 등온 적정 열량측정법 실험을 C12 및 2C8 IA에 대해 고정밀 VP-ITC 적정 열량측정 시스템(Microcal Inc.)을 이용하여 수행하였다. IgG1 용액을 15°C에서 1×PBS(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 Origin™ 패키지를 이용하여 수행하였다.
- [0103] CMC 측정. 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 Z33 단편 IA의 CMC는 이들 분자를 다양한 농도로 특정 양의 나일 레드와 인큐베이션함으로써 결정되었다. 나일 레드의 스톱 용액은 염료를 50 μM로 아세톤에 용해시켜 초기에 제조하였다. 10 μL 스톱 용액을 몇 개의 원심분리 튜브에 로딩하고, 여기서 용매를 실온 하에 증발시켜 나일 레드의 건조 질량을 수득하였다. 다양한 농도의 펩티드 용액을 탈이온수에서 제조한 후, 동일 부피를 건조 나일 레드를 함유한 원심분리 튜브에 첨가하고 밤새 에이징시켰다. 이후, 560 nm에서 고정 여기 파장을 갖는 Fluorolog 형광계(Jobin Yvon, Edison, NJ)에 의해 나일 레드의 형광 스펙트럼을 모니터링하였고; 방출 스펙트럼은 580-720 nm로 모니터링되었다. IA의 CMC는 방출 최대의 청색-이동에 의해 결정되는 반면, 이러한 전이는 인큐베이션된 펩티드가 이들의 CMC 값을 초과함에 따라 발생한다.
- [0104] 티오플라빈 T(ThT) 분광 검정. ThT 스톱 용액을 탈이온수에서 50 μM로 제조하였다. 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 100 μM Z33 IA를 볼텍싱시키고 동일 부피의 ThT 스톱 용액과 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 형광 강도를 440 nm의 여기(슬릿 폭 5 nm) 및 482 nm의 방출(슬릿 폭 10 nm)로 Fluorolo 형광계(Jobin Yvon, Edison, NJ)에 의해 측정하였다.
- [0105] 전장 Z33 면역-양친매성 분자의 분자 설계. 펩티드 양친매성 분자, 펩티드-중합체 컨쥬게이트, 펩티드-약물 컨쥬게이트 등과 같은 이러한 양친매성 펩티드 컨쥬게이트의 설계는 다양한 초분자 나노구조를 생성하는데 널리 사용되어 왔다. 친수성 Z33 펩티드 서열(FNMQQRRFYELHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD)(SEQ ID NO: 1) 및 소수성 알킬 사슬로 구성된 IgG 결합 면역-양친매성 분자는 면역섭유(IF)의 빌딩 모티프로서 기능하도록 설계되었다. Z33 펩티드는 높은 결합 친화도($K_d=43$ nM)로 IgG의 Fc 부분에 특이적으로 결합하는 단백질 A의 2-나선 유도체이다(도 1A).
- [0106] 2개의 IA, C12-Z33 및 2C8-Z33(도 1B)을 라우르산 모이어티(C12) 또는 2개의 옥탄산 모이어티(2C8)를 Z33 펩티드의 N-말단에 직접 컨쥬게이션함으로써 합성하였다. 도 1C에 도시된 바와 같이, IA는 IF로 자가-조립되고 항체 혼합물 용액으로부터의 IgG에 특이적으로 결합할 것으로 예상되었다. 순수한 Z33 펩티드는 또한 Z33 분자와 Z33 함유 IF 사이의 생물활성을 비교하기 위해 합성되었다. 다른 제어 분자 C12-SZ33은 C12를 스크램블링된 서열을 갖는 Z33의 N-말단에 컨쥬게이션함으로써 설계되었다. 모든 분자는 자동 고체상 펩티드 합성(SPPS) 방법 및 RP-

HPLC를 사용하여 합성 및 정제되었다. 분석용 HPLC 및 질량 분석법을 사용하여 합성된 화합물의 순도 및 예상 분자 질량을 확인하였다.

[0107] 실시예 2

[0108] 전장 Z33 면역-양친매성 분자의 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 에이징 후, 투과 전자 현미경(TEM) 및 원편광 이색성(CD)을 이용하여 조립된 나노구조의 형태를 특성규명하였다.

[0109] 본 발명의 IgG 정제 방법에서 pH 조건의 중요한 역할을 고려하여, pH 변화에 대한 C12-Z33의 자가-조립 거동을 평가하였다. 중성 pH가 결합 조건으로 일반적으로 사용되는 반면, 산성 pH는 단백질 A 친화성 컬럼으로부터 항체를 용리시키는데 사용된다. 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 분자는 상기 언급된 둘 모두의 pH 조건에서 잘 용해될 수 있고, 나노섬유로 자가-조립될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 100 μ M 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-조립되었음을 나타내었다. 나노섬유의 길이는 마이크로미터 규모로 제시되었으며, 잘 제어될 수 없었다.

[0110] 자가-조립된 구조 내의 분자 패키징을 추가로 이해하기 위해, 원편광 이색성(CD)을 사용하여 펩티드 이차 구조를 연구하였다. 약 222 nm($n-\pi^*$) 및 208 nm($\pi-\pi^*$)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 패키징되는 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 패키징을 이의 자유 상태에서부터 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.

[0111] 실시예 3

[0112] 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, 이는 C12-Z33 IF와 IgG1 사이에 결합이 발생할 수 있는지 조사하는 우수한 방법이다. 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.

[0113] 표 2. pH 7.4의 포스페이트-완충 염수에서 15°C에서 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

[0114]

[0115] 표 2. pH 7.4의 포스페이트-완충 염수에서 15°C에서 IgG1에 대한 Z33-기반 리간드의 결합에 대한 열역학적 파라

미터. 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

[0116]

[0117]

전형적인 ITC 실험에서, PBS 완충액 중 100 μ M C12-Z33의 용액을 밤새 에이징시킨 후, 15°C, pH 7.4에서 동일 완충액 중 2 μ M IgG1의 용액에 주입하였다. 전형적인 써모그램(thermogram) 및 결합 등온선이 도 3A에 제시되어 있으며, 리간드 당 보고된 열역학적 파라미터는 표 2에 요약되어 있다. IgG1에 대한 C12-Z33 IF의 결합에 대한 ITC 결과는 650의 K_d 를 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_d 로 IgG1에 단단히 결합하는 것으로 입증된 Z33 펩티드를 합성하였다. IgG1에 대한 Z33 펩티드의 결합 특성을 PBS, pH 7.4에서 15°C에서 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.

[0118]

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°C에서 IgG 용리 완충액(pH 2.8)에서 수행하였다(도 3B).

[0119]

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°C에서 2 μ M IgG1 용액에 100 μ M C12-SZ33 IA를 주입하여 이들의 결합 능력을 측정함으로써 ITC 실험을 수행하였다. 도 3D의 써모그램 및 결합 등온선은 IgG1과 Z33 펩티드 사이의 특정 상호작용을 암시한다.

[0120]

실시예 4

[0121]

IF의 기능의 보편성을 추가로 입증하기 위해, 이중 사슬 알킬화된 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°C에서 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 패키징은 생물활성에서의 성능에 크게 영향을 줄 수 있는 기능적 특성 뿐만 아니라 이의 형태학적 특성을 결정한다.

[0122]

실시예 5

[0123]

면역글로불린 및 Fc 부분을 갖는 다른 분자의 정제를 위한 잠재적 적용.

[0124]

구성 아미노산의 다양성은 수소 결합, π - π 스택킹, 소수성 붕괴, 및 자가-조립 펩티드 나노섬유 사이의 정전

기적 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 과정은 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 가능성이 높다(도 5A).

[0125] 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 Na₂SO₄의 PBS 용액에서 침전된다. PBS 용액 중 C12-Z33의 제타 전위는 -7.61 mV이며, Na₂SO₄의 첨가는 IF의 표면 상의 전하를 차단하여, 이에 따라 침전을 유도할 수 있다. IgG1의 경우, 이는 5 mM C12-Z33 뿐만 아니라 0.6 M Na₂SO₄에 잘 용해된다. 그러나, 5분 동안 20 μM IgG1 및 5 mM C12-Z33을 혼합한 후, 0.6 M Na₂SO₄를 첨가한 후 침전이 관찰되었다. 침전물의 조성을 결정하기 위해, 2개의 병행 실험을 수행하였다. 0.6 M Na₂SO₄ 중 5 mM C12-Z33을 원심분리하고, 자외선-가시광선(UV-Vis) 분광법을 이용하여 Na₂SO₄의 첨가 전 및 후에 280 nm에서 상층액의 흡광도 변화를 모니터링하였다. 0.6 M Na₂SO₄ 중 5 mM C12-Z33 및 20 μM IgG1의 혼합물에 대해 동일 절차를 수행하였다. 도 5C에 제시된 바와 같이, 대부분의 C12-Z33 IF는 0.6 M Na₂SO₄에 의해 침전될 수 있다. 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% 초과 IgG1이 상층액으로부터 제거된 것을 암시한다. 지금까지, 본 발명의 IF가 새로운 친화성 침전제 역할을 할 가능성이 예비 입증되었다.

[0126] 실시예 6

[0127] 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 IA의 분자 설계. 2개의 α-나선을 함유하는 Z33(FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAIKSIRDD)(SEQ ID NO: 1)의 펩티드 서열을 D와 P 사이에서 분리하고 두 시리즈의 면역-양친매성 분자: 1) 나선1(FNMQQRRFYALHD)(SEQ ID NO: 2)-기반 면역-양친매성 분자; 2) 나선2(PNLNEEQRNAIKSIRDD)(SEQ ID NO: 5)-기반 면역-양친매성 분자로 알킬화하였다. 본 발명자는 분리, 알킬화 및 자가-조립 후 펩티드 구조의 가능한 입체형태 변화에 관심이 있었다. C16 및 2C8 알킬 사슬을 나선1의 C-말단 및 나선2의 N-말단에 컨주게이션시켰다(도 6A). 본 발명자가 나선1 및 나선2 펩티드의 상이한 말단에 알킬 꼬리를 컨주게이션시킨 이유는 Z33 펩티드에 나타낸 바와 같이 나선과 다른 세그먼트 사이의 상대적 위치를 유지하기 위해서였다. IA는 특정 조건 하에서 소수성 코어에 포획된 알킬 세그먼트 및 수성 환경을 향한 펩티드 서열과 회합될 것으로 추정되었다(도 6B). 모든 분자는 자동 고체상 펩티드 합성(SPPS) 방법 및 RP-HPLC를 사용하여 합성 및 정제되었다. 분석용 HPLC 및 질량 분석법을 사용하여 합성된 화합물의 순도 및 예상 분자 질량을 확인하였다.

[0128] 실시예 7

[0129] 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 IA의 분자 조립. IA의 자가-조립은 2-단계 작업을 통해 달성되었다. IA를 먼저 HFIP로 전처리하여 합성 및 정제 공정 동안 형성된 임의의 기존의 나노구조를 제거하였다. 이후, HFIP를 증발을 통해 제거한 다음 pH 7.4에서 1 mM의 최종 농도에 도달하도록 탈이온수를 후속 첨가하고 밤새 에이징시켰다. 알킬화가 어떻게 자가-조립된 IA의 형태에 영향을 미칠 수 있는지 조사하기 위해, 모든 IA에 대해 TEM을 이용하여 조립된 형태를 시각화하고 100 μM IA 용액의 대표적인 TEM 이미지를 도 7에 나타내었다. 도 7A 및 7C는 나선1-C16 및 C16-나선2 둘 모두가 각각 직경이 9.6 ± 1.3 nm 및 12.4 ± 1.7 nm 인 긴 나노섬유 구조로 자가-조립되었음을 보여준다. 전하 스크리닝으로 인해 2개 이상의 나노섬유가 또한 나노벨트로 합쳐지는 것이 관찰되었다. 나노섬유의 길이는 마이크로미터 규모로 제시되었으며, 잘 제어될 수 없었다. 옥탄산(C8)에 의한 이중-사슬 알킬화의 경우, 동일 조건 하에서 나선1-2C8 및 2C8-나선2 둘 모두에 대한 필라멘트 조립체가 또한 발견되었다(도 7B 및 7D). 그러나, 이러한 필라멘트는 비교적 짧으며, 또한 길이에 있어 더 다분산성으로 보인다. 또한, 직경의 변동이 관찰되었고, 가장 작은 필라멘트는 나선1-2C8 필라멘트의 경우 11.0 ± 1.4 nm 및 나선2-2C8 필라멘트의 경우 9.3 ± 1.3 nm의 직경을 갖는다. 본 발명자는 큰 이중-사슬의 입체 효과가 조립체의 형태에 중요한 역할을 할 수 있다고 가정한다. 그러나, 상이한 펩티드 양친매성 시스템에 대한 입체 효과의 영향은 다양하다. Stupp 및 동료들은 알킬 사슬의 말단 그룹에서 입체 효과를 증가시키는 것이 초나선 피치를 감소시키는 경향이 있음을 발견하였다. Tat 펩티드-기반 나노섬유 시스템에서, 쿼트-C8 컨주게이트만이 필라멘트 나노구조로 자가-

조립될 수 있고, 디-C8 또는 모노-C8 컨쥬게이트에 대해서는 나노구조가 관찰되지 않았다.

[0130] 실시예 8

[0131] 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 단일-사슬 및 이중-사슬 알킬화된 IA의 차이를 깊게 이해하기 위해, CMC 및 이차 구조에 대한 추가 연구가 수행되었다. 다양한 IA에 대한 임계 마이셀 농도(CMC) 값은 용매 극성에 따라 형광을 발하는 친유성 염료인 나일 레드를 사용하여 측정되었다. 소수성 환경에 노출시 집중적인 형광은 수성 매질에서 강하게 켄칭되고 적색-이동할 수 있다. 수용액에서 상이한 농도의 IA와 함께 인큐베이션될 때, 나일 레드는 자가-조립된 나노구조에 의해 제공되는 소수성 코어로 분할되는 것을 선호하고, IA의 CMC는 방출 최대의 청색-이동이 발생했을 때 결정되었다. 도 8A는 나일 레드 형광 강도에 대한 나선1-C16의 농도의 플롯을 보여준다. 방출 최대 파장은 660 nm에서 0.5 μ M까지 가장 높았고, 이후 660 nm에서 635 nm까지의 청색-이동이 1 μ M의 농도에서 먼저 발생하는데, 이는 그 사이의 CMC 값을 암시한다. 유사하게, C16-나선2, 나선1-2C8, 및 2C8-나선2에 대한 CMC 값은 도 8B-8D로부터 수득될 수 있다. 이중-사슬 알킬화는 단일-사슬 알킬화와 비교하여 더 높은 CMC 값을 나타낸다. 2C8-나선2는 나선1-2C8보다 더 강한 응집 경향을 보여주는데, 그 이유는 전자가 더 낮은 범위의 CMC 값을 갖기 때문이다.

[0132] 실시예 9

[0133] 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 알킬화된 IA의 이차 구조 조사.

[0134] 자가-조립된 구조 내의 분자 패키징을 이해하기 위해, 원편광 이색성(CD)을 사용하여 펩티드 이차 구조를 연구하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 나선1 및 나선2 둘 모두는 Z33에서 분리된 후 α -나선 구조를 잃고 무작위 코일 CD 스펙트럼을 표시하였고(도 16). 이는 안정성에 대한 상호 의존성을 파괴함으로써 발생할 수 있다. 나선1-C16 및 C16-나선2 조립체는 약 218 nm($n-\pi^*$ 전이)에서 강한 음의 신호를 나타내는데, 이는 둘 모두의 IA에서 β -시트 이차 구조의 형성을 암시한다. β -시트 입체형태는 잘 정의된 일차원 나노구조의 형성을 촉진시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 이미 입증되었다. 흥미롭게도, 약 225 nm($n-\pi^*$ 전이) 및 208 nm($\pi-\pi^*$ 전이)에서 음의 신호가 나선1-2C8 및 2C8-나선2에서 관찰되었으며, 이는 α -나선 이차 구조의 존재를 나타낸다. 결과적인 CD 스펙트럼을 폴리리신 기초 스펙트럼의 선형 조합을 사용하여 피팅시켜 각 이차 구조의 함량을 평가하였다(도 17). β -시트는 나선1-C16 및 C16-나선2 IA의 주요 성분인 반면, 이중-사슬 알킬화된 IA는 α -나선이 우세한 이차 구조를 나타낸다.

[0135] 실시예 10

[0136] 자가-조립된 IA에서 이차 구조의 성분을 추가로 확인하기 위해, β -시트 표면에 결합시 형광 방출이 크게 향상된 형광 염료 티오프라빈-T(ThT)를 사용하여 나선1-기반 IA에서 β -시트 이차 구조의 존재를 조사하였다. 도 18에 도시된 바와 같이, 482 nm에서 사전-인큐베이션된 나선1 및 나선1-2C8의 ThT 방출은 순수한 ThT 용액에 비해 유사하거나 약간 증가한 수준을 유지하므로, 그러한 IA에 존재하는 지배적인 β -시트는 없음을 의미한다. 반대로, 사전-인큐베이션된 둘 모두의 나선1-C16에서 형광의 급격한 증가가 관찰되었으며, 이는 CD에 의해 조사된 우세한 β -시트 이차 구조에 해당한다.

[0137] CD 신호는 자가-조립 필라멘트 대신에 유리 단량체로부터 유래될 수 있다고 주장할 수 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위해, α -나선 IA(나선1-2C8로 표시됨) 및 β -시트 IA(나선1-C16으로 표시됨)의 희석된 용액의 CD 스펙트럼을 촬영하였다. 도 10A 및 10B는 IA 농도가 상응하는 CMC 값을 초과할 때만 CD 신호가 우세해지고 안정되는 것을 보여주며, 이는 필라멘트 구조에서 IA의 패키징이 CD 신호의 주요 원인임을 나타낸다.

[0138] α -나선 및 β -시트의 기하학에서 알려진 바와 같이, 나선간 축 거리는 약 12Å인 반면, β -가닥은 5Å 간격이며, 이는 α -나선보다 β -시트의 형성에 더 가까운 패키징이 필요함을 나타낸다. 더 긴 알킬 사슬은 자가-조립된 나노구조에서 더 단단하게 패키징되고 심지어 결정화되는 경향이 있으며, 이는 펩티드 세그먼트를 더 근접하게 할 수 있음이 입증되었다. 2C8 컨쥬게이션의 경우, 2개의 C8 사슬이 비대칭 방식으로 나선1 및 나선2에 컨쥬게이션된 것에 주목하여야 한다. 2개의 C8은 나선1의 C-말단에서 2개의 인접한 리신에 컨쥬게이션되었고, 나선2의 경우 하나는 N-말단 아민에 그리고 다른 하나는 리신의 측쇄에 컨쥬게이션되었다. 비대칭 구조를 갖는 알킬 사슬의 수를 증가시키면 입체 장애를 크게 증가시키고 응집을 약화시켜, 비교적 큰 CMC, 느슨한 패키징, 및 더 넓은 필라멘트 직경을 발생시킬 수 있다.

[0139] 실시예 11

[0140] 단일 알킬 사슬 길이의 효과.

[0141] 이중-사슬 알킬화된 IA의 느슨한 패키징은 α -나선 조립체의 형성 및 안정화를 촉진하기 때문에, 본 발명자는 단일 알킬화된 사슬의 길이를 단축시키는 것이 동일 효과를 가질 수 있다고 가정한다. 이러한 가정을 확인하기 위해, 2개의 더 짧은 알킬 사슬(라우르산, C12; 옥탄산, C8)을 나선1 및 나선2에 개별적으로 컨주게이션하고 조립체를 TEM 및 CD로 특성구명하였다. 100 μ M의 가장 높은 시험 농도에서 나선1-C8 또는 C8-나선2에 대해 잘 정의된 나노구조 및 방출 최대 전이는 관찰되지 않았고, 이는 이러한 2개의 IA가 상기 농도 아래에서 자가-조립될 수 없음을 나타낸다. 나선1-C12 및 C12-나선2(도 11A 및 11B)는 각각 직경이 12.2 ± 1.4 nm 및 9.1 ± 1.6 nm 인 긴 나노섬유로 회합되었다. 나노섬유의 직경은 화학 구조의 길이 뿐만 아니라 패키징 상태와도 관련이 있다는 것에 주목하여야 한다. 따라서, 더 강한 소수성 상호작용으로 인해 C12 컨주게이트보다 더 낮은 CMC 값(도 11C 및 11D) 및 더 단단한 패키징을 갖는 C16 컨주게이션된 IA에서 더 작은 직경을 관찰한 것은 놀라운 일이 아니다. CD 스펙트럼(도 11E 및 11F)에서, 나선1-C8 및 C8-나선2 둘 모두는 컨주게이션되지 않은 펩티드의 낮은 응집 능력으로 인해 이들이 보여준 것과 유사한 CD 결과를 나타낸다. 흥미롭게도, β -시트 신호는 나선1-C12의 CD 스펙트럼에 나타나지만, 그럼에도 불구하고, C12-나선2에서 α -나선 이차 구조가 관찰되었고, 이는 본 발명자의 이전의 가정을 확인시켜 주었다. 단일-사슬 알킬화의 경우, 더 긴 알킬 사슬을 갖는 자가-조립된 IA는 인접한 IA 분자들 사이의 단단한 패키징을 유도하고 β -시트의 형성을 촉진할 수 있는 반면, 짧은 사슬 알킬화된 IA의 느슨한 패키징은 α -나선 구조에 더 많은 공간을 제공할 수 있다.

[0142] 표 3: 단편화된 항체 결합 펩티드를 갖는 IA의 개요

약어	IA	주요 이차 구조(100 μ M)	CMC (μ M)
나선1-C8	FNMQQQRRFYALHDK (SEQ ID NO: 3)-C ₈ H ₁₅ O	무작위 코일	>100
나선1-C12	FNMQQQRRFYALHDK(SEQ ID NO: 3)-C ₁₂ H ₂₁ O	β -시트	5-10
나선1-C16	FNMQQQRRFYALHDK(SEQ ID NO: 3)-C ₁₆ H ₃₁ O	β -시트	0.5-1
나선1-2C8	FNMQQQRRFYALHDKK(SEQ ID NO: 4)-(C ₈ H ₁₅ O) ₂	α -나선	10-20
C8-나선2	C ₈ H ₁₅ O- PNLNEEQRNAKIKSIRDD (SEQ ID NO: 5)	무작위 코일	>100
C12-나선2	C ₁₂ H ₂₁ O- PNLNEEQRNAKIKSIRDD (SEQ ID NO: 5)	α -나선	2-5
C16-나선2	C ₁₆ H ₃₁ O- PNLNEEQRNAKIKSIRDD (SEQ ID NO: 5)	β -시트	0.5-1
2C8-나선2	(C ₈ H ₁₅ O) ₂ -KPNLNEEQRNAKIKSIRDD (SEQ ID NO: 7)	α -나선	5-10

[0143]

[0144] 실시예 12

[0145] 면역섬유 결합 조성물 및 면역섬유 스페이서 조성물을 포함하는 대안적인 면역섬유 조성물의 제조.

[0146] 전술한 바와 같이, 공동-조립된 면역섬유 시스템에서 결합 면역섬유 분자(C12-VVKKGGZ33) 및 스페이서 분자(C12-VVEE))를 조합함으로써 개선된 면역섬유 기반 결합 시스템을 설계하였다(도 19A). 결합 분자는 원래 디자인 C12-Z33보다 탄소 사슬과 결합 펩티드 Z33 사이에 6개의 아미노산 잔기 VVKKGG를 더 함유한다. 2개의 발린(VV, 적색)은 일차원 구조의 형성을 촉진한다. 스페이서 분자에서 2개의 글루타민산(EЕ, 청색)이 친수성 세그먼트로 설계되고, 2개의 리신(KK, 청색)이 이에 따라 KK와 EE 사이의 정전기적 상호작용을 위해 설계되어, 결합 및 스페이서 분자의 교대 패키징을 유도하였다. 2개의 글리신(GG, 녹색)을 알킬 사슬로부터 항체 결합 펩티드(Z33)를 추가로 분리하기 위해 설계하였다. 결합 및 스페이서 분자를 수용액에 용해시킬 때, 이들 두 분자는 표면에서 빠져 나온 결합 리간드 Z33에 의해 일차원 면역섬유로 균일하게 공동-조립될 수 있다(도 19B). 2개의 Z33 리간드의 거리는 공동-조립을 위한 결합 및 스페이서 분자의 물비를 조정함으로써 제어될 수 있다. 자가-조립된 C12-VVEE(도 20A) 및 C12-VVEE(도 20B)의 대표적인 TEM 이미지는 pH 7.4의 PBS에서 원통형 나노섬유 구조를 보여준다. 도 20C는 10:1 물비의 C12-VVEE 및 C12-VVKKGGZ33로 공동-조립된 나노섬유를 보여준다.

[0147] 실시예 13

[0148] 새로운 면역섬유 결합 시스템에 의한 IgG 결합 및 침전 능력을 조사하기 위해, 100 μ l의 요망되는 면역섬유 용액을 30분 동안 IgG(10:1 물비의 C12-VVKKGGZ33 및 IgG로)와 함께 인큐베이션한 다음 암모늄 설페이트를 1 M의 최종 농도로 첨가하여 면역섬유 및 IgG의 침전을 유발하였다. 자가-조립된 C12-VVKKGGZ33 및 IgG를 혼합할 때, 암모늄 설페이트의 첨가 후 침전은 관찰되지 않았다. 흥미롭게도, 10:1의 물비로 IgG 및 공동-조립된 C12-VVEE

및 C12-VVKKGGZ33을 함유하는 용액은 염을 첨가한 후 흐려졌다. 침전물을 원심분리하고 상층액 중의 IgG 농도를 분석한 후, 약 30%의 IgG가 용액으로부터 침전되었다. 280 nm에서 모니터링되는 ProA 겔립(TSKgel® Protein A-5PW, 20 μm, 35×4.6mm)으로 IgG 농도를 정량하였다. 이 예비 결과는 용액에 동일 양의 결합 분자와 IgG가 있을 때, 스페이서 분자의 첨가가 IgG 포획 및 침전에서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. 결합 분자를 이격시키고 면역섭유 표면에 결합 리간드 Z33를 돌출시키면 더 큰 리간드 가요성 및 IgG 접근성이 제공된다.

[0149] 실시예 14

[0150] 공동-조립된 면역섭유 결합 시스템에서 IgG 결합 효율 및 최적 침전 조건을 증가시키기 위해, 결합 분자 대 스페이서 분자의 비, 결합 분자 대 IgG의 비, 염 농도, 결합 및 스텔팅 시간 등을 포함하는 여러 요소가 계속 최적화될 것이다. C12-VVEE 및 C12-VVKKGGZ33의 몰비 및 C12-VVKKGGZ33의 몰비가 먼저 연구되었고 예비 결과가 도 21에 도시되었다. 10:2 몰비의 C12VVKKGGZ33 대 IgG 및 1 M 암모늄 설페이트에서, C12-VVEE 대 C12-VVKKGGZ33의 5개 몰비(5:1, 10:1, 25:1, 50:1, 100:1)를 시험하였다. 도 21A는 스텔팅 아웃(salting out) 및 원심분리 후 상층액에서의 IgG 백분율을 보여준다. C12-VVEE의 함량이 증가함에 따라, 용액으로부터 더 많은 IgG가 침전되었고 50:1에서 약 75%의 최고 수율에 도달하였다. 100:1에서 침전 수율의 감소는 고 농도로 인한 면역섭유의 낮은 용해도 때문일 수 있음에 유의하여야 한다. 이후, C12-VVKKGGZ33 대 IgG의 몰비를 도 3B에서 더 나은 성능을 보여준 25:1 및 50:1 면역섭유 시스템을 사용하여 10:4, 10:2에서 10:1로 조정하였다. 도 3B에 도시된 바와 같이, 이들 2개의 면역섭유 시스템은 C12-VVKKGGZ33 대 IgG의 비가 증가함에 따라 IgG 침전 수율이 증가하는 동일한 경향에 따랐다. 최상의 조건에서, 50:1 면역섭유 시스템에서 10:1 비의 C12-VVKKGGZ33 대 IgG로 99% IgG 침전 수율에 도달할 수 있었다. 이 흥미로운 결과는 공동-조립된 면역섭유가 높은 IgG 결합 및 침전 능력을 보유함을 확인시켜 준다. IgG 침전 및 회수 조건의 최적화에 대한 보다 체계적인 연구가 수행될 것이다.

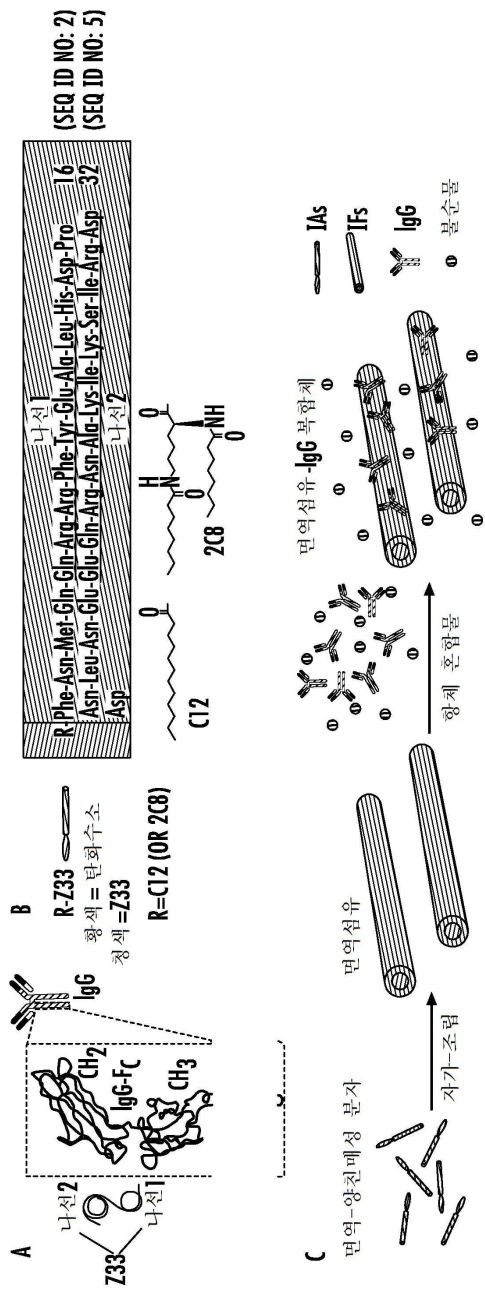
[0151] 본원에 인용된 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은 각각의 참고문헌이 참조로서 포함되는 것으로 개별적 및 구체적으로 표시되고, 이의 전체내용이 본원에 기재되는 것과 동일한 정도로 참조로서 본원에 포함된다.

[0152] 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 두고자 하는 것이 아니다. 명세서 내의 어떤 언어도 본 발명을 실시하는데 필수적인 것으로 임의의 청구되지 않은 구성요소를 나타내는 것으로 해석되어선 안 된다.

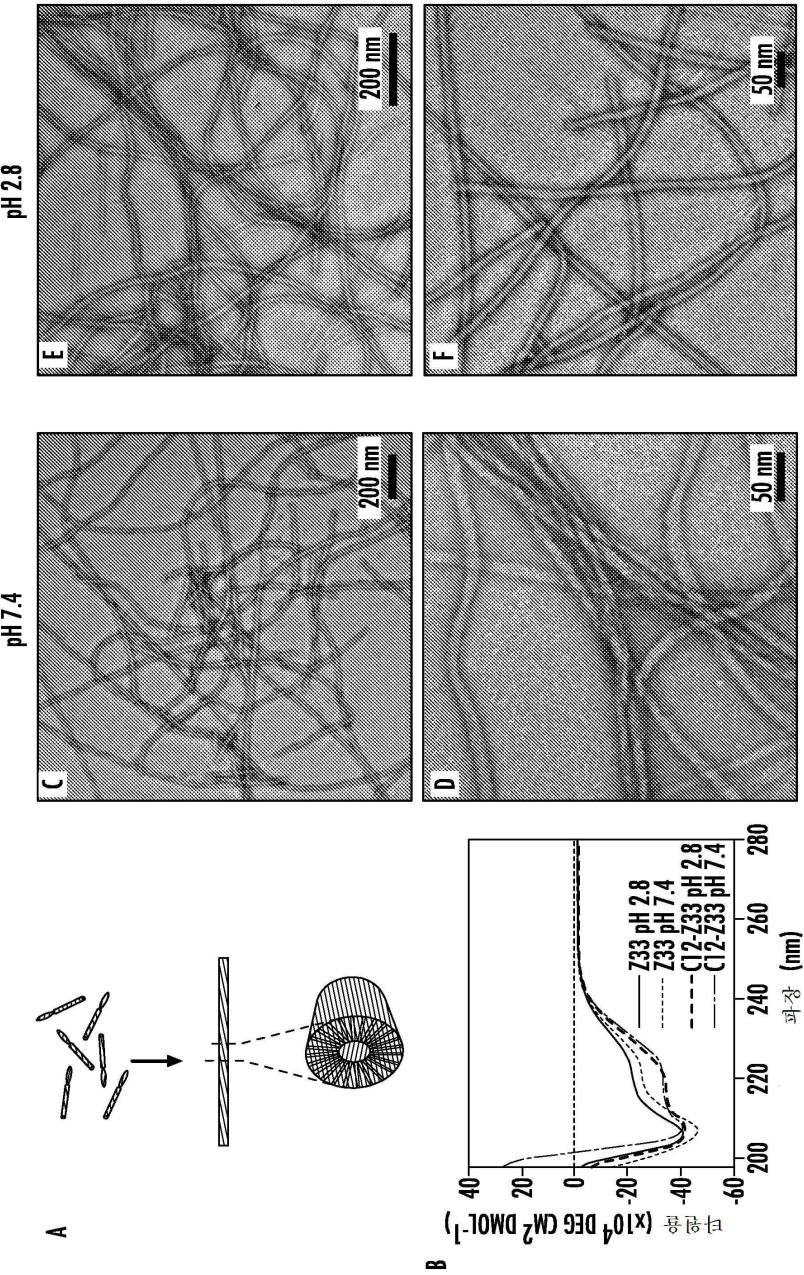
[0153] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자에게 공지된 최상의 방식을 포함하는 본 발명의 바람직한 구현예가 본원에 기재된다. 이들 바람직한 구현예의 변형은 상기 기재된 경우 당업자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자는 당업자가 상기 변형을 적절하게 이용할 것으로 예상하며, 본 발명자는 본원에 구체적으로 기재된 것과 달리 본 발명을 실시하고자 한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이 본원에 첨부된 청구범위에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 또한, 모든 가능한 변형의 상기 기재된 요소의 임의의 조합이 본원에 달리 지시되지 않는 한 또는 문맥에 의해 달리 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 의해 포함된다.

도면

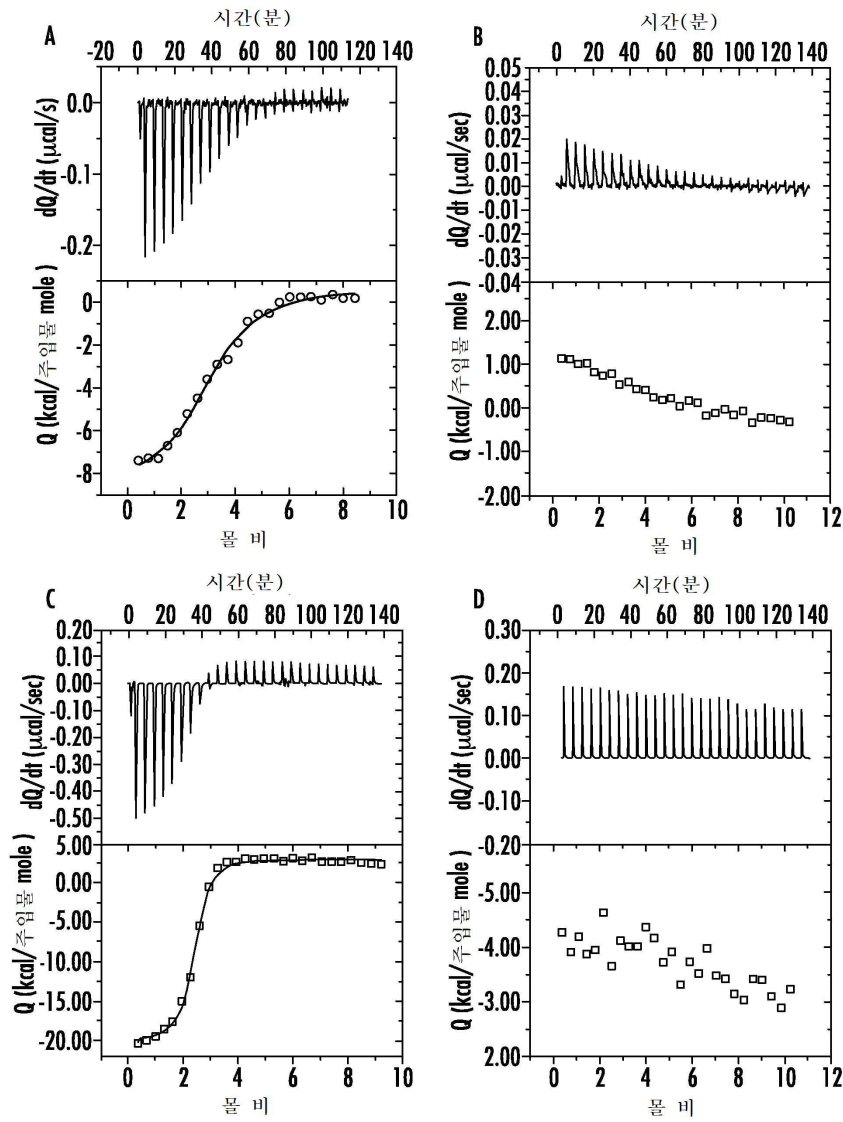
도면1



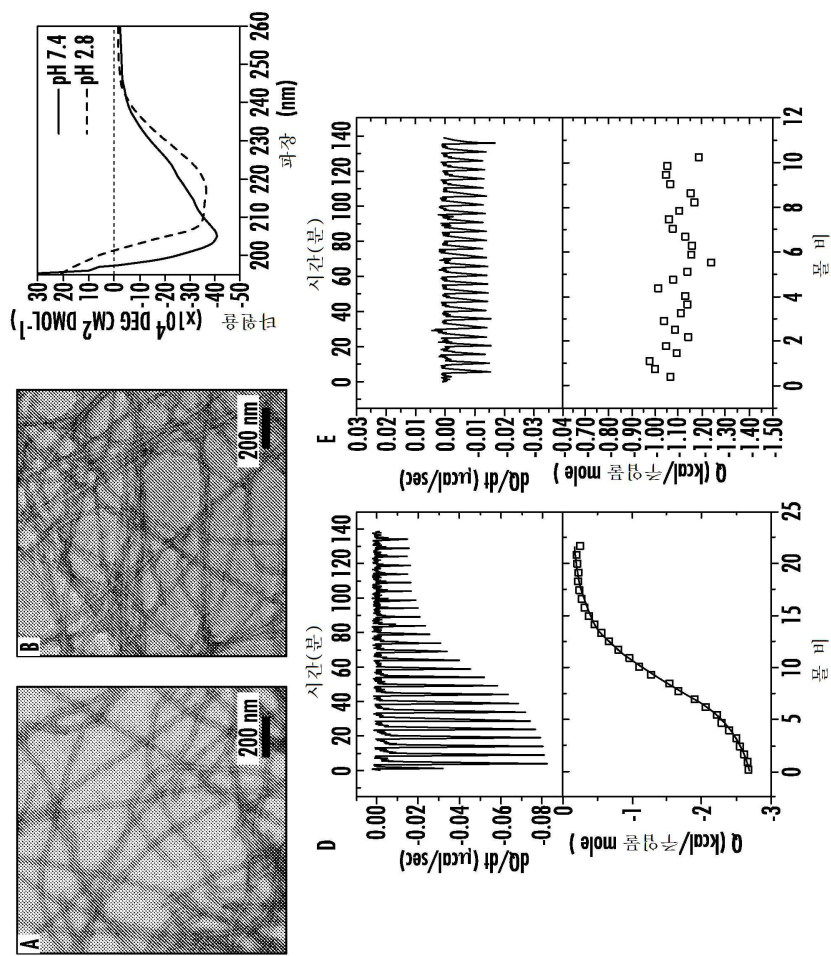
도면2



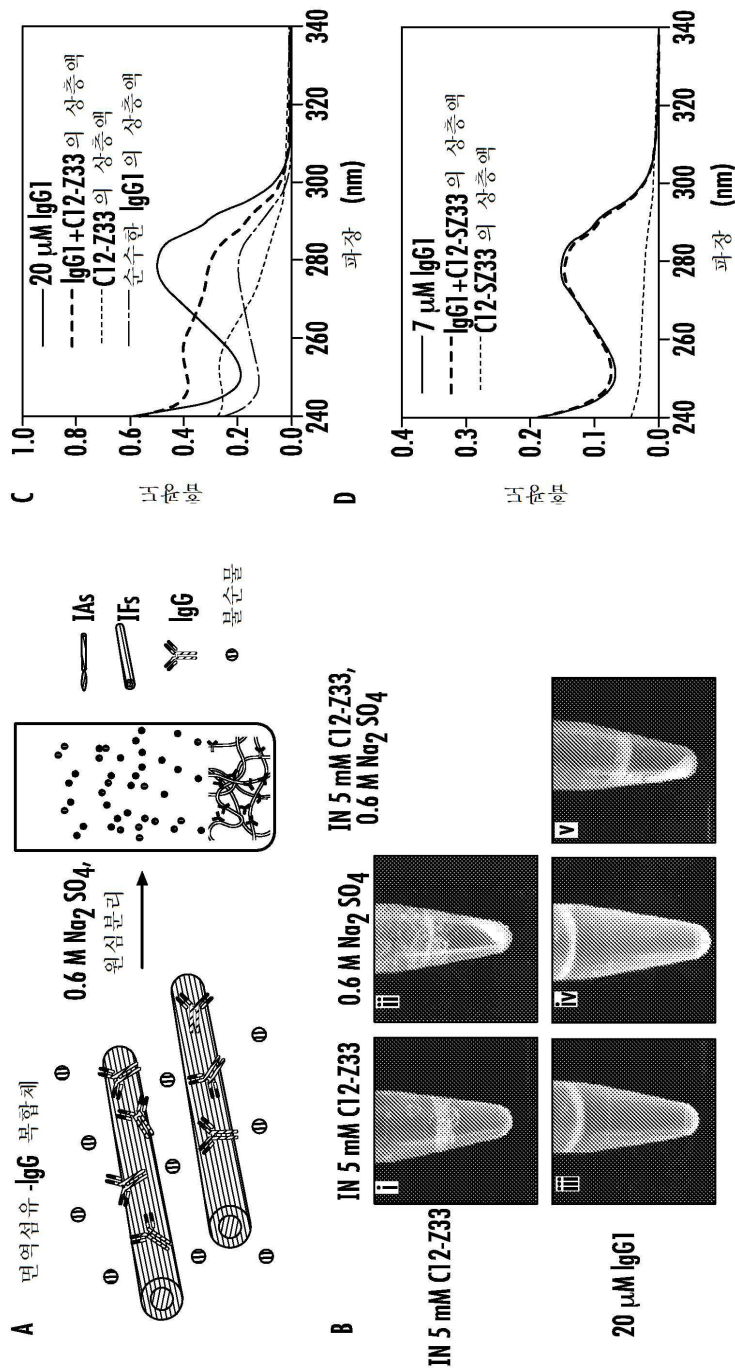
도면3



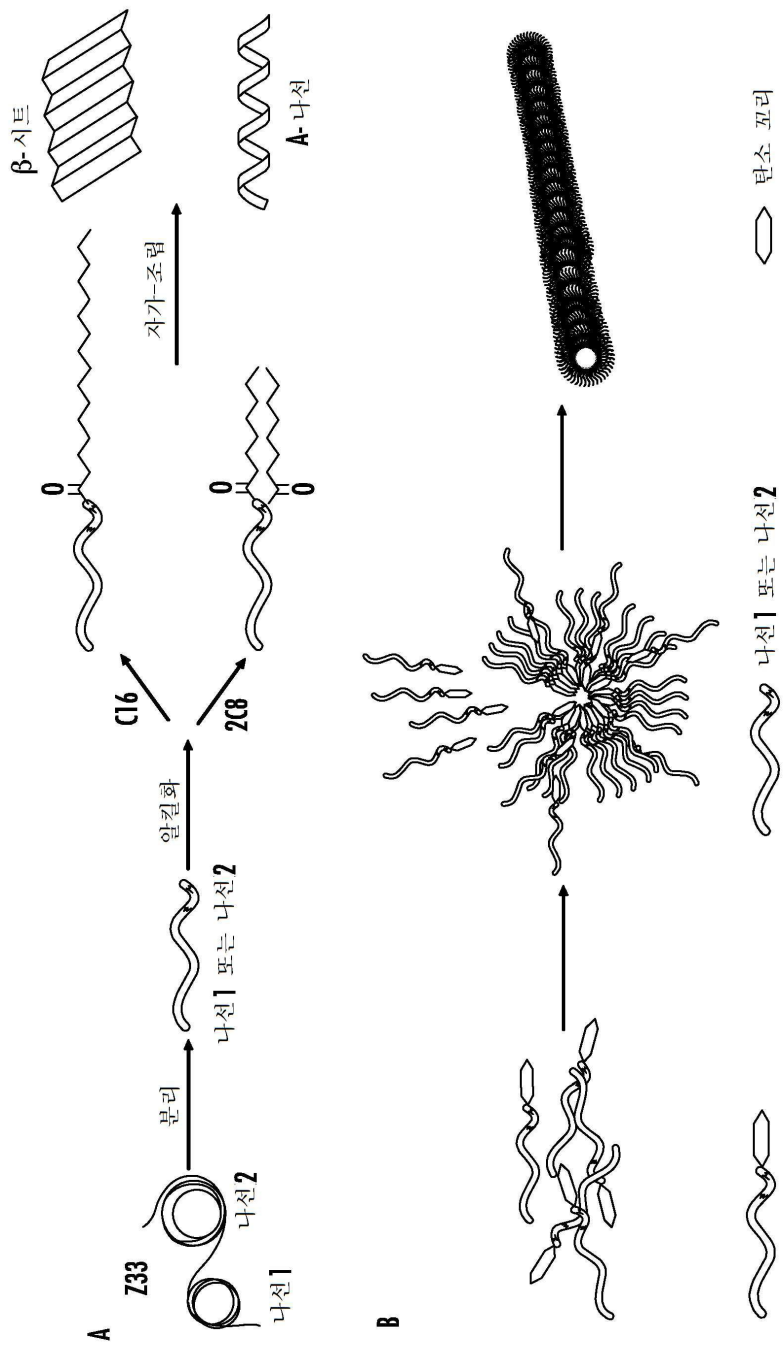
도면4



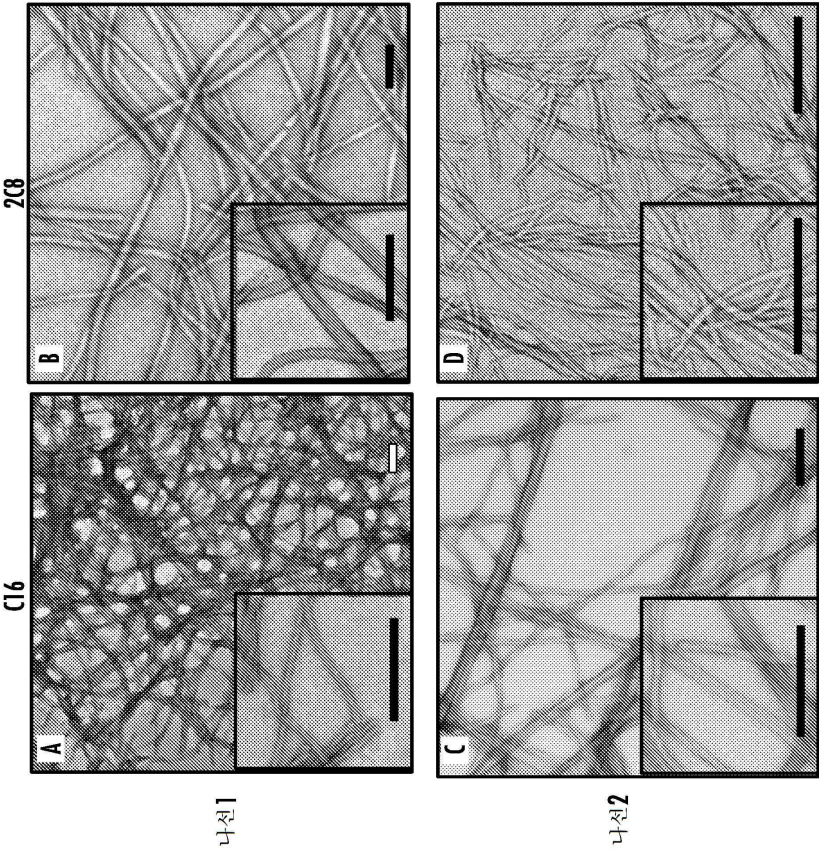
도면5



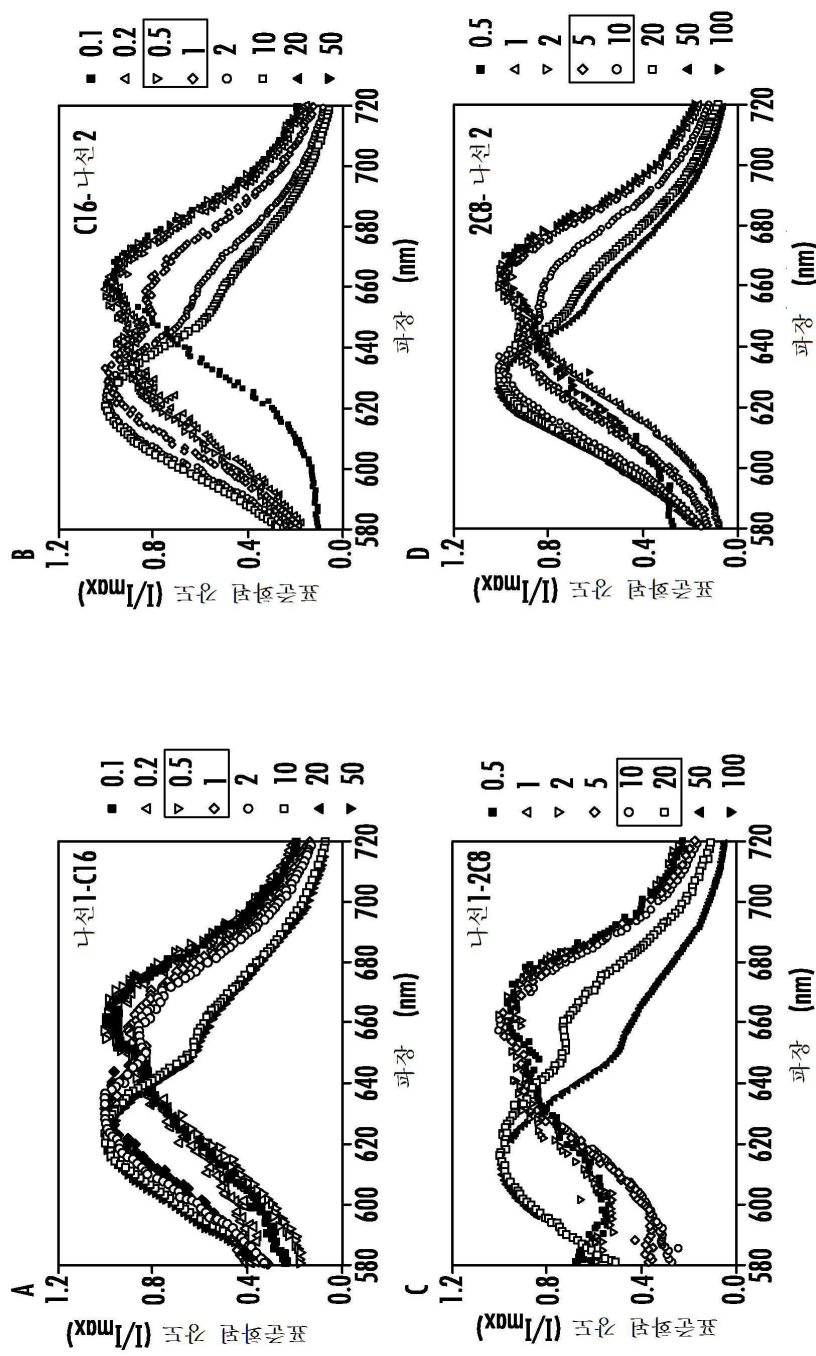
도면6



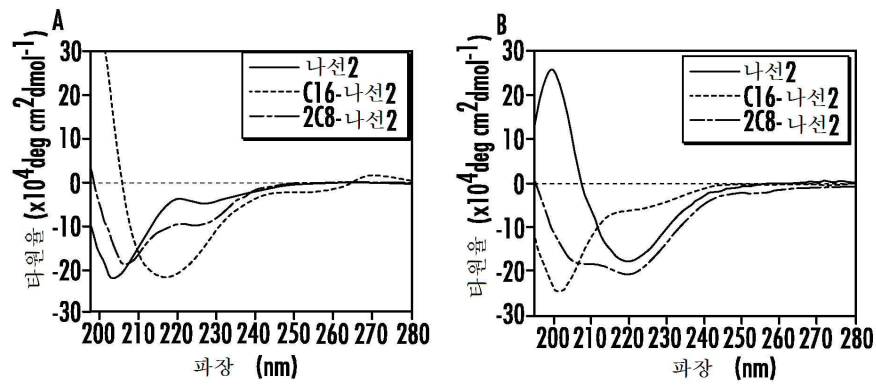
도면7



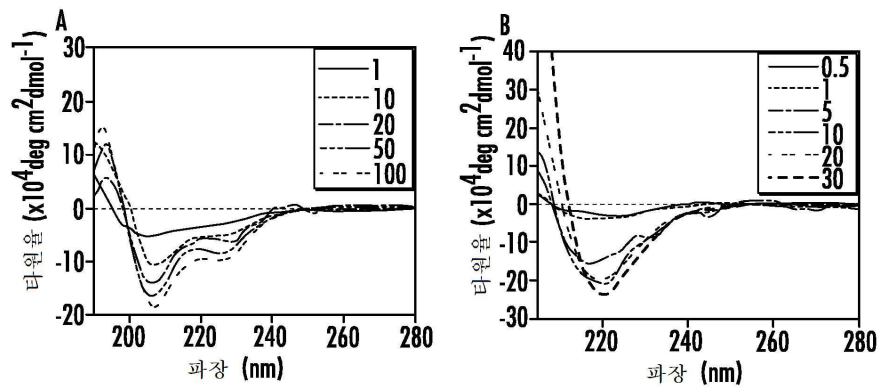
도면8



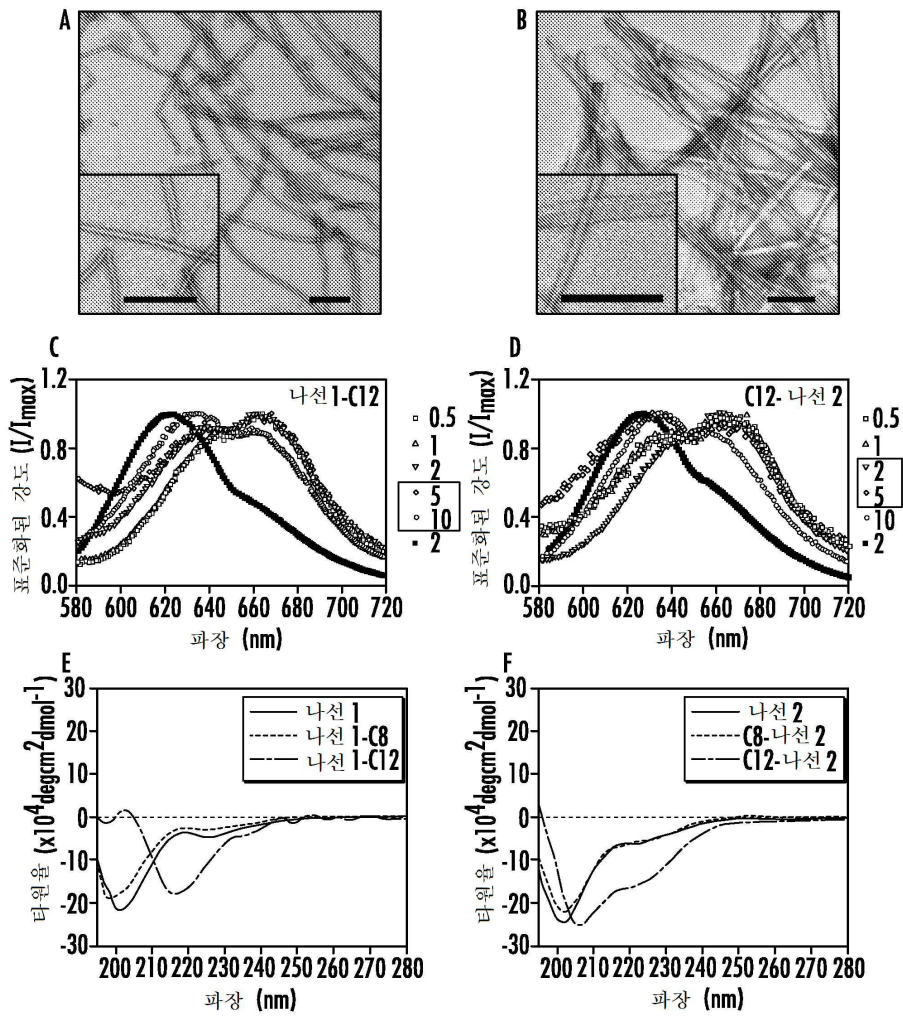
도면9



도면10

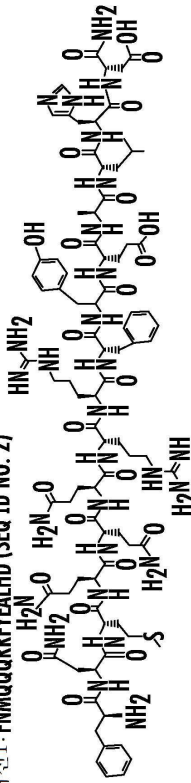


도면11

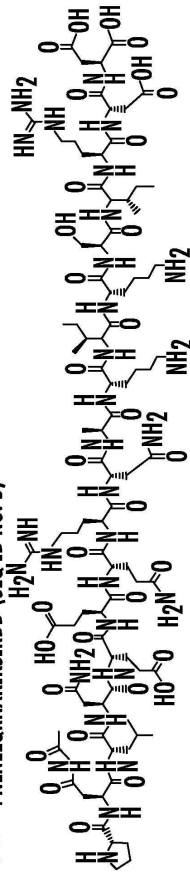


도면12

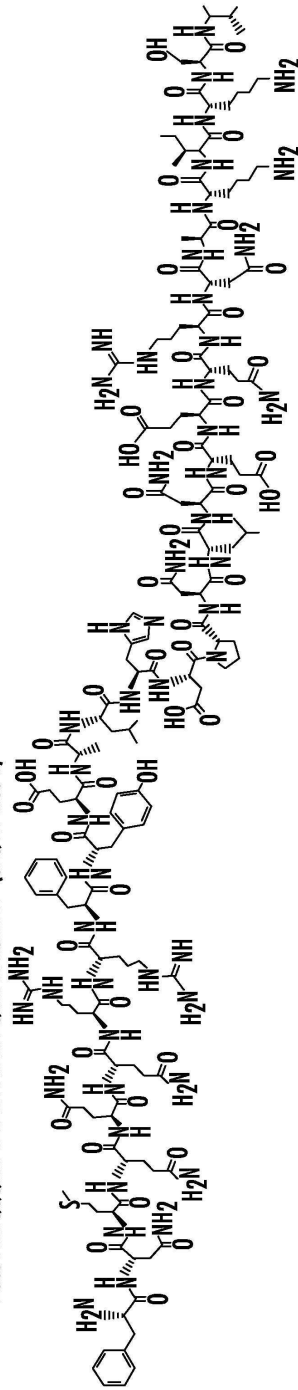
나선1: FNMQQRRFYALHD (SEQ ID NO: 2)



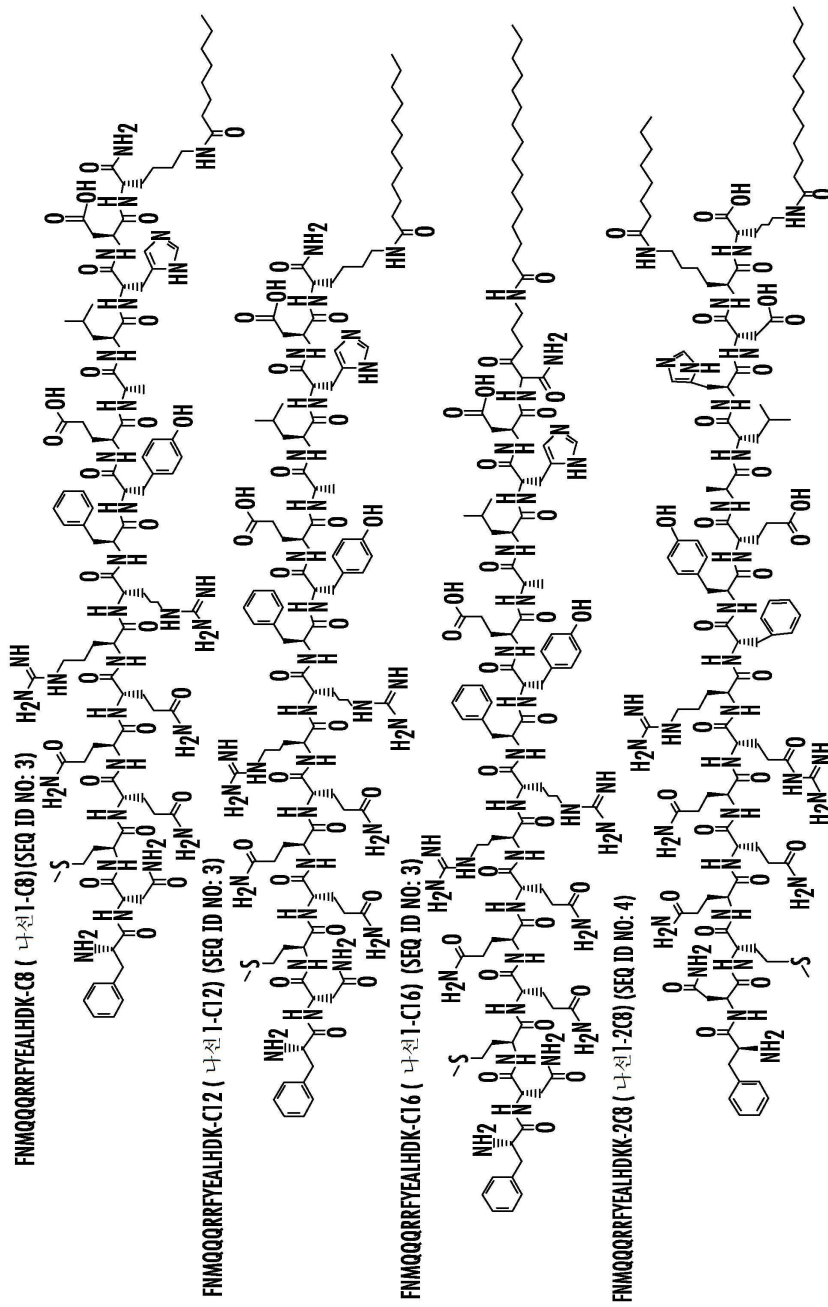
나선2: PNLNEQRNAKISIRDD (SEQ ID NO: 5)



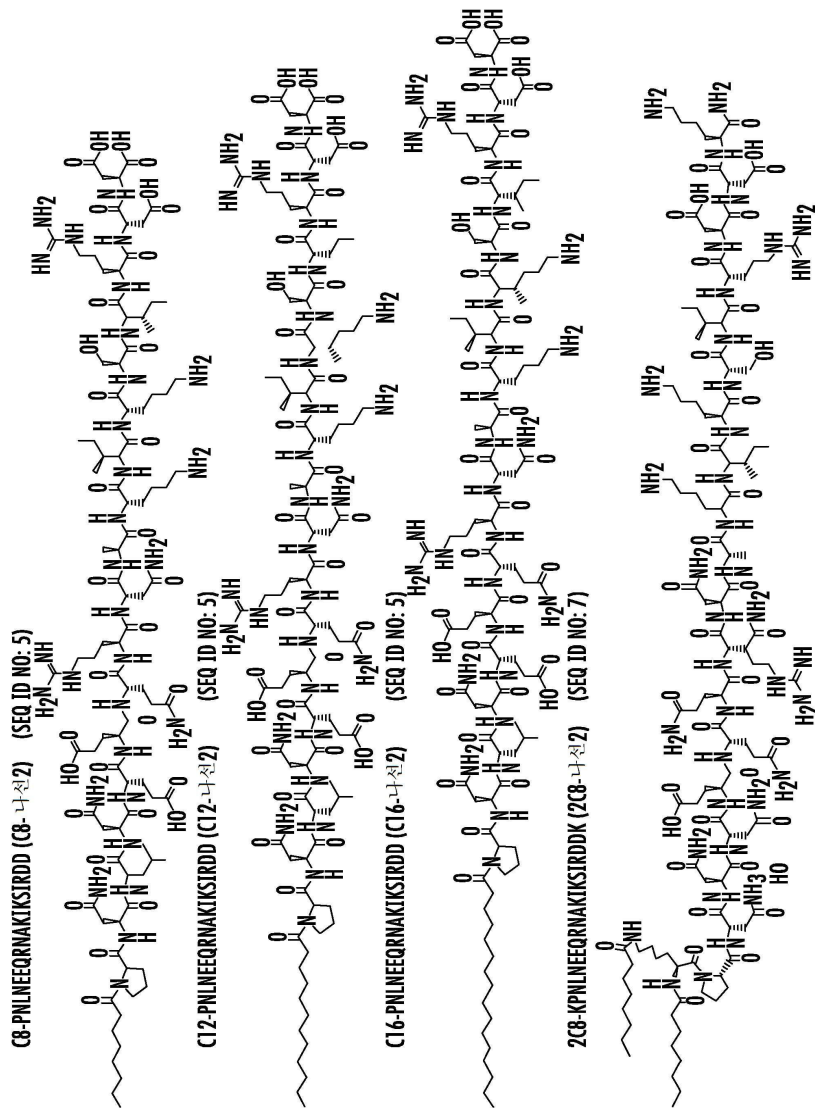
Z33: FNMQQRRFYALHDPNLNEQRNAKISIRDD (SEQ ID NO: 1)



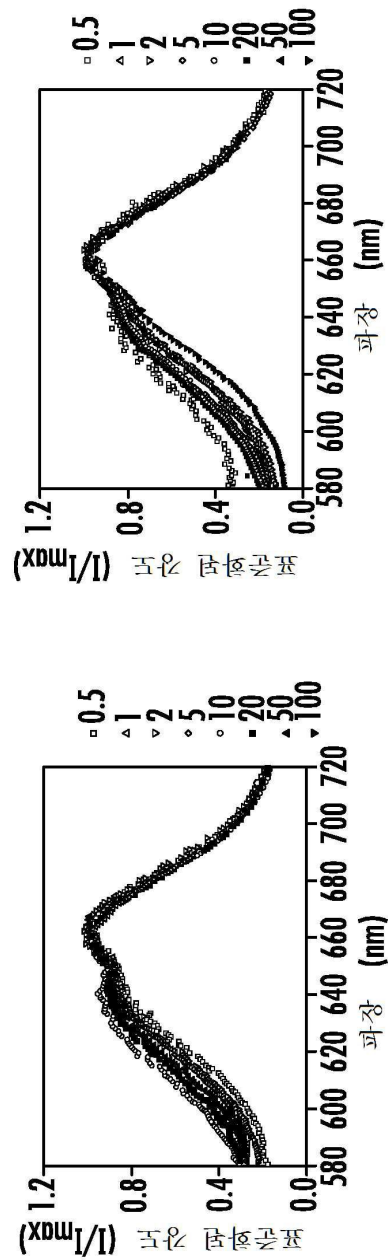
도면13



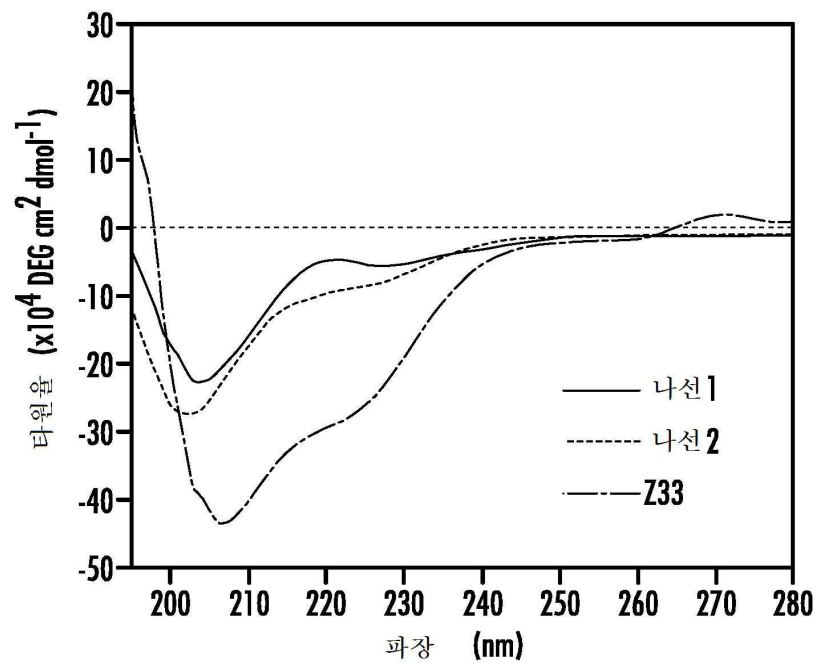
도면14



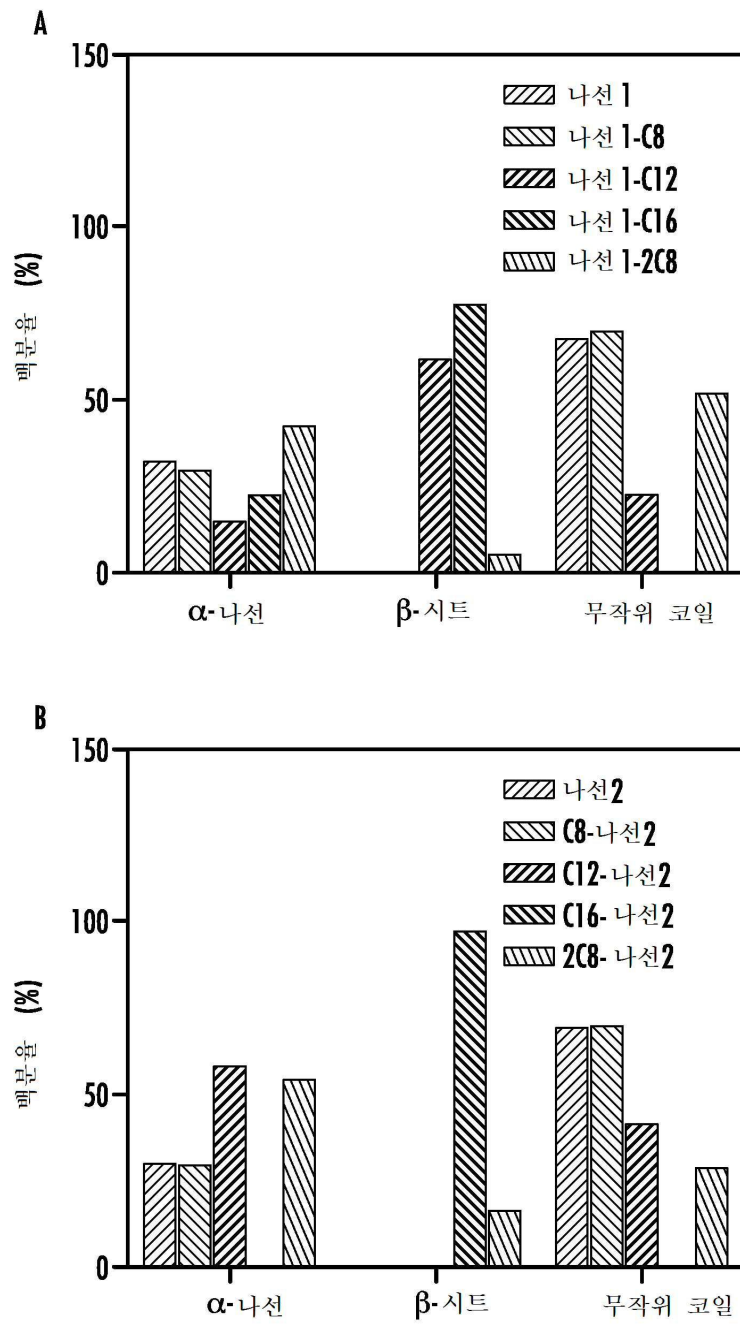
도면15



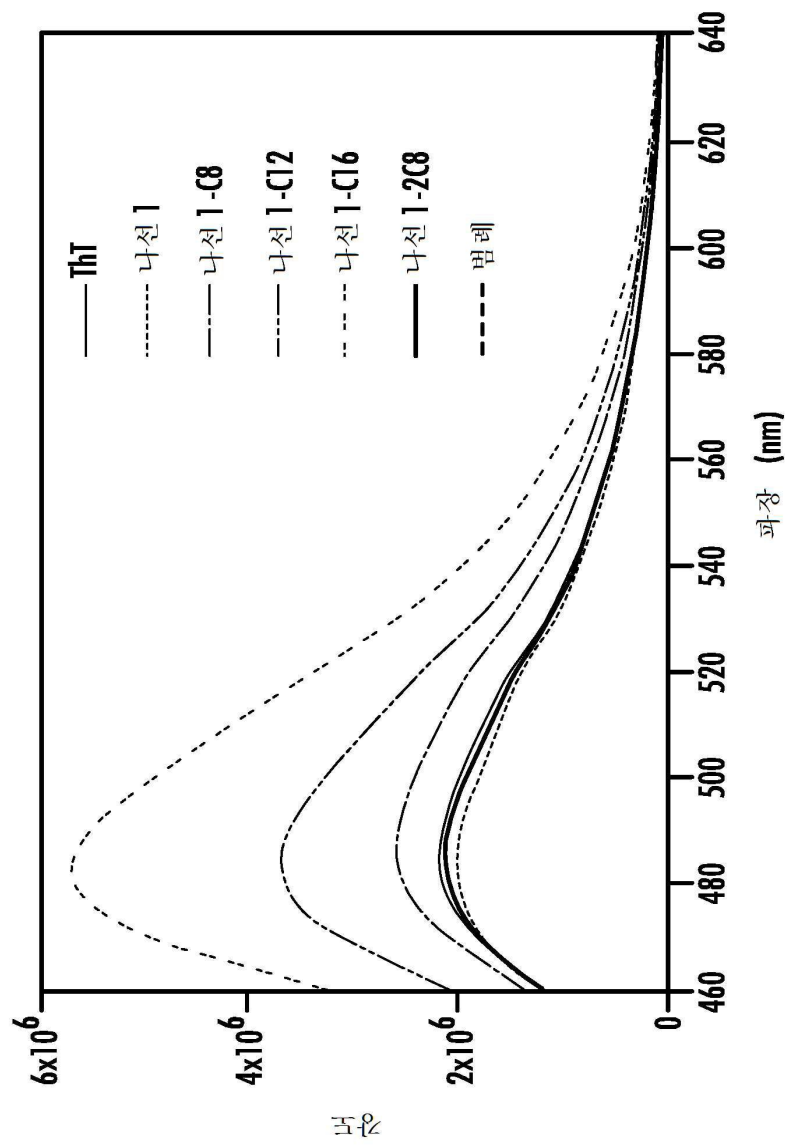
도면16



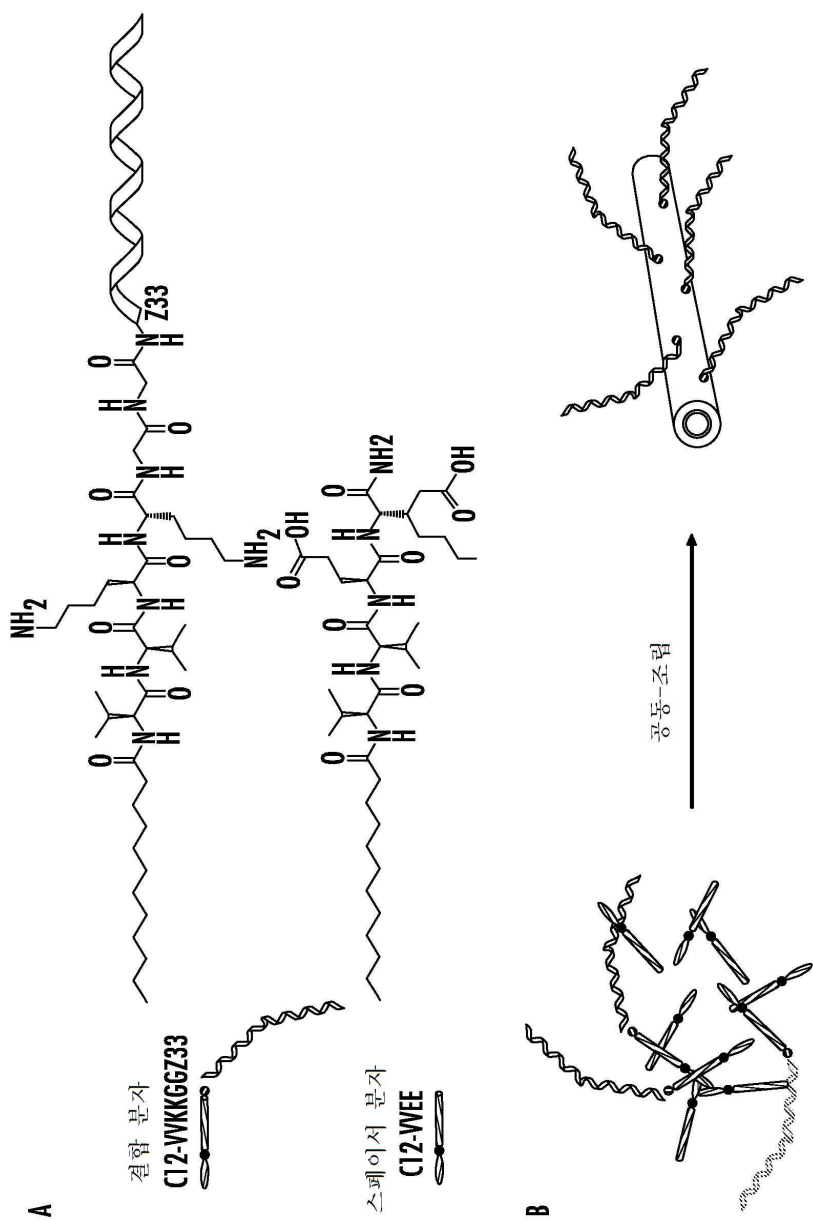
도면17



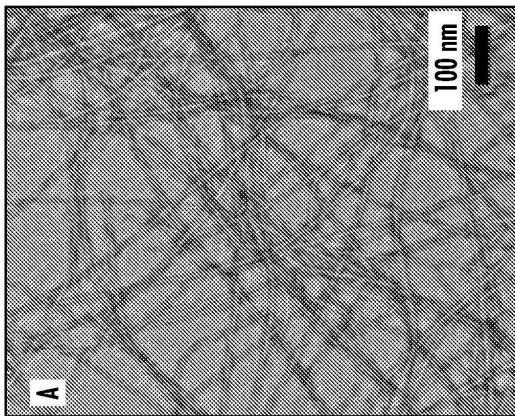
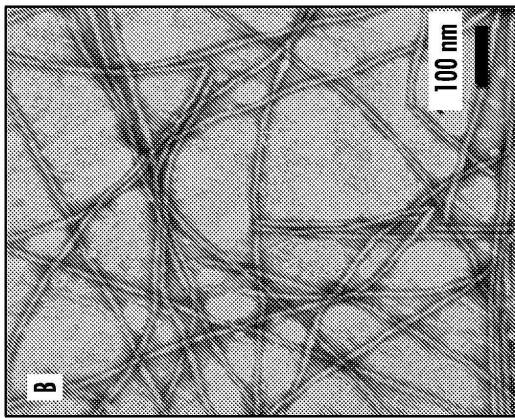
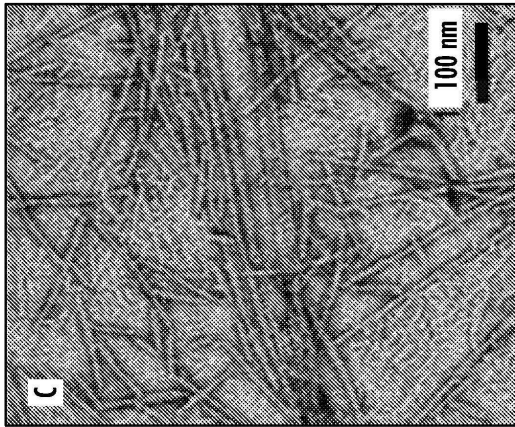
도면18



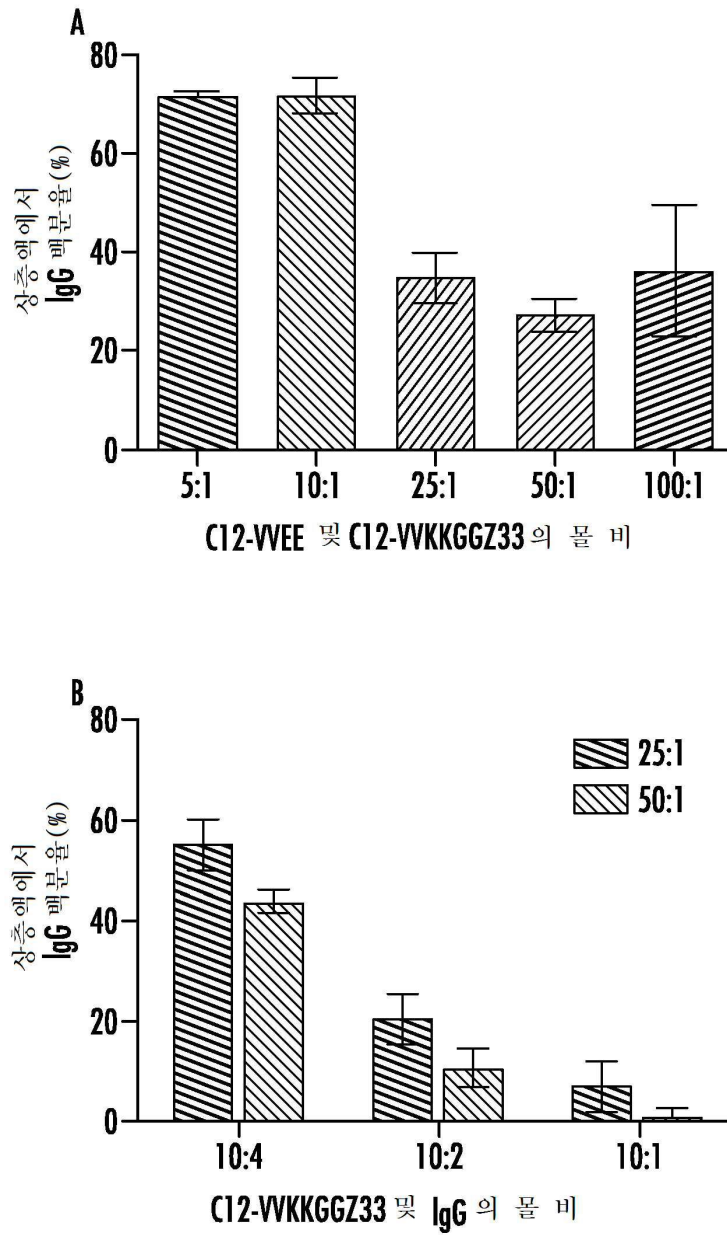
도면19



도면20



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Johns Hopkins Technology Ventures

<120> PRESERVATION OF ALPHA-HELICAL PEPTIDES WITHIN SUPRAMOLECULAR
FILAMENTOUS ASSEMBLIES FOR PROTEIN PURIFICATION

<130> P14755-02

<150> 62/547,256

<151> 2017-08-18

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 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> 15

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 2

Phe Asn Met Gln Gln Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp

1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 3

Phe Asn Met Gln Gln Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 17

<212>

> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 4

Phe Asn Met Gln Gln Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Lys

1 5 10 15

Lys

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 5

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 6

Phe Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile

1 5 10 15

Arg Asp Asp

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 7

Lys Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile

1 5 10 15

Arg Asp Asp

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 8

Gly Ala Asn Pro Asn Ala Ala Gly

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213>

> synthetic sequence

<400> 9

Val Val Lys Lys Gly Gly

1 5

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> synthetic sequence

<400> 10

Val Val Glu Glu

1